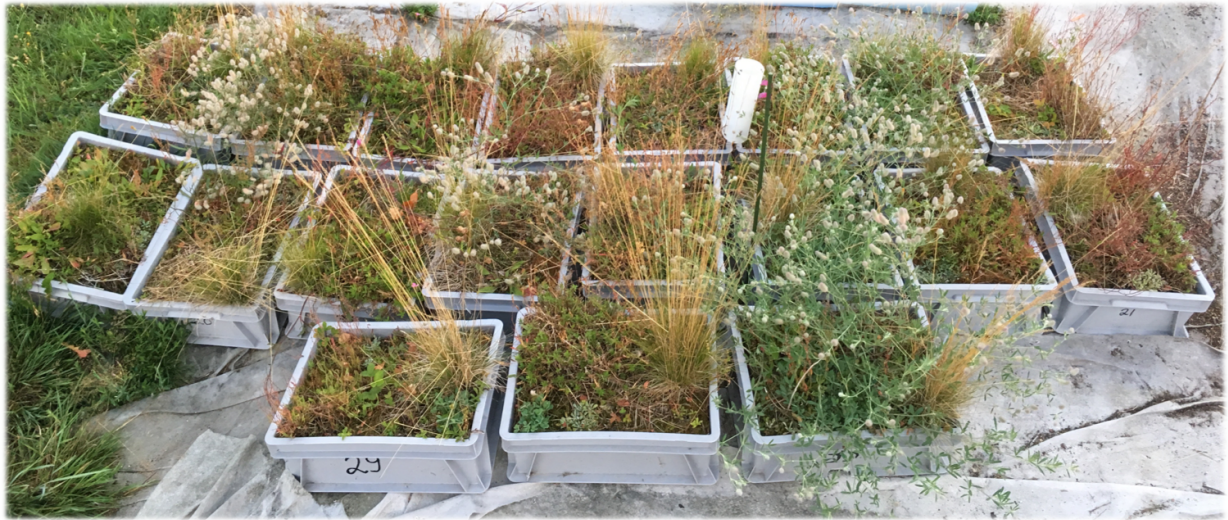


*Inverkan av mildare vintrar och en främmande art på klorofyllfluorescensen och pigmenthalterna hos inhemska ängsväxter.*



*Jalmar Donner*

*Helsingfors universitet | Bio- och miljövetenskapliga fakulteten | Växtbiologi*

*Pro gradu-avhandling 5.5 2020*



Tiedekunta – Fakultet – Faculty <b>Bio- och miljövetenskapliga fakulteten</b>		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme <b>Utbildningsprogrammet för biologi</b>	
Tekijä – Författare – Author <b>Jalmar Donner</b>			
Työn nimi – Arbetets titel – Title <b>Inverkan av mildare vintrar och en främmande art på klorofyllfluorescensen och pigmenthalterna hos inhemska ängsväxter</b>			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track <b>Växtekologi</b>			
Työn laji – Arbetets art – Level <b>Pro gradu</b>		Aika – Datum – Month and year <b>maj 2020</b>	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages <b>56</b>
Tiivistelmä – Referat – Abstract  <p>Klimatuppvärmningen förväntas leda till förändringar i vinterförhållanden i nordliga regioner. Bland annat förväntas förändringarna medföra ett tunnare och mer efemärt snötäcke samt kraftigare temperaturfluktuationer under vintern. Ett bestående snötäcke underlättar övervintringen för många fleråriga växter och det är oklart hur förändringar i snötäckets tjocklek och varaktighet kommer att påverka dessa.</p> <p>Ett mesokosmexperiment utfördes för att undersöka den kortsiktiga inverkan av olika vinterförhållanden samt en främmande kvävefixerande art <i>Lupinus polyphyllus</i> på klorofyllfluorescensen och pigmenthalterna hos ängsarter i södra Finland. Tolv olika naturligt förekommande ängsarter som representerade olika övervintringsstrategier planterades i varje mesokosm i början av sommaren 2016 i Vik Helsingfors. Ett år senare planterades i hälften av mesokosmerna en lupin. Hälften av mesokosmerna övervintrade på Nätö biologiska station på Åland över vintern 2017-18. Andra hälften övervintrade vid Lampis biologiska station i Tavastehus. Till vardera ort fördes lika många mesokosmer med och utan lupin. I Lampis övervintrade ängsväxterna under ett djupt och bestående snötäcke som isolerade dem från stränga lufttemperaturer från december till mars. På Nätö bildades först i januari ett tunt snötäcke som smälte bort i mitten av mars. I experimentet representerade Nätö sådana vinterförhållanden som förväntas råda i södra Finland i framtiden till följd av en längre framskriden klimatuppvärmning. Under experimentets gång mättes arternas klorofyllfluorescens samt koncentrationer av klorofyll och flavonoider i bladen upprepade gånger med hjälp av optisk mätapparat. Lupinens tillväxt och blomning följdes med under våren och sommaren 2018.</p> <p>Inga betydande skillnader syntes i ängsarternas klorofyllfluorescens och klorofyllhalter mellan övervintringsorterna vilket tyder på att dessa är väl anpassade till varierande vinterförhållanden. Flavonoidkompositionen hos ängsväxterna föreföll regleras av ljusintensitet och temperatur under olika årstider. Små minskningar i klorofyllhalter hos en del av ängsarterna antydde att dessa vantrivdes i lupinens närvaro. Detta antogs bero på lupinens skuggande inverkan. Två städsegröna ängsarter verkade däremot gynnas av kvävetillskottet från lupinen vilket antydde av höjda klorofyllhalter hos dessa under sommaren 2018. Lupinen övervintrade framgångsrikt i Lampis men verkade lida av de maritima och snöfattiga vinterförhållandena på Nätö. Detta tog sig uttryck i reducerad produktion av blad och blomställningar under tillväxtsäsongen 2018.</p> <p>Resultaten tyder på att naturligt förekommande ängsväxter i Finland är relativt toleranta mot de förväntade förändringarna i fastlandets vinterförhållanden medan förändringarna kommer att vara till nackdel för lupinen.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <b><i>Lupinus polyphyllus</i>, ängsarter, övervintring, klorofyllfluorescens, anthocyanin, flavonol, snötäcke</b>			
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors <b>Timo Saarinen, Helena Åström</b>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited <b>E-thesis</b>			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information <b>Pro gradu-arbetet utfördes i forskargruppen PECC (Plant Ecophysiology and Climate Change), Helsingfors universitet.</b>			

Tiedekunta – Fakultet – Faculty <b>Faculty of Biological and Environmental Sciences</b>		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme <b>Degree Programme in Biology</b>	
Tekijä – Författare – Author <b>Jalmar Donner</b>			
Työn nimi – Arbetets titel – Title <b>Effects of mild winter conditions, and an introduced species (<i>Lupinus polyphyllus</i>), on chlorophyll fluorescence and pigment concentrations of native meadow species in Finland</b>			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track <b>Plant ecology</b>			
Työn laji – Arbetets art – Level <b>Master's thesis</b>		Aika – Datum – Month and year <b>May 2020</b>	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 56
Tiivistelmä – Referat – Abstract  <p>Climate warming is expected to cause changes in winter conditions in northern regions. These changes include reduced depth and duration of the snow cover, and strong fluctuations in winter temperatures.</p> <p>A mesocosm experiment was planned to study the short term effects of contrasting winter conditions, and an introduced species (garden lupin; <i>Lupinus polyphyllus</i>), on chlorophyll fluorescence and pigment concentrations of native meadow species in southern Finland. Twelve different meadow species, representing different overwintering strategies were planted in each mesocosm at the beginning of summer in 2016 in Viikki, Helsinki. One year later, a lupin was planted in half of the mesocosms. Over the winter 2017-18, one half of the mesocosms was moved to Nätö on the Åland islands, and the other half was moved to Lammi, Hämeenlinna. To each site, both lupin-containing mesocosms and lupin free controls were moved. In the inland site in Lammi, the mesocosms spent the winter covered by a thick snow cover that isolated them from harsh air temperatures from beginning of December to end of March. In coastal Nätö, a thin snow cover formed in January and melted by mid-March. In the experiment, the maritime winter climate on Nätö represented such winter conditions that are expected to be common on the mainland in the future, when climate warming progresses. Leaf chlorophyll fluorescence as well as concentrations of leaf chlorophyll and flavonoids were repeatedly measured nondestructively for all species using optical apparatus. Growth and flowering of the lupin was monitored during spring and summer 2018.</p> <p>No marked differences were observed in the meadow species chlorophyll fluorescence and content between sites, indicating that these are well adapted to variable winter conditions. The flavonoid composition of the meadow species seemed to be regulated by seasonal changes in light intensity and temperature. Small reductions in chlorophyll content for some species indicated that these were disadvantaged by the lupins presence. This was attributed to the lupins shadowing effect. In contrast, two evergreen species seemed to take advantage of the nitrogen input from the lupin in terms of higher chlorophyll content in summer 2018. The lupin overwintered successfully in mainland Lammi, but seemed to suffer from the maritime and snow poor winter conditions in Nätö, which led to reduced production of leaves and inflorescences during the growing season 2018.</p> <p>The results indicate that native meadow species in Finland are relatively tolerant of the expected changes in mainland winter conditions, whereas these changes will be disadvantageous for the lupin.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <b>winter climate change, <i>Lupinus polyphyllus</i>, meadow species, overwintering, chlorophyll fluorescence, anthocyanin, flavonol, snow cover</b>			
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors <b>Timo Saarinen, Helena Åström</b>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited <b>E-thesis</b>			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information <b>This work was done for the PECC research group (Plant Ecophysiology and Climate Change), University of Helsinki.</b>			



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<b>1. Introduktion</b>	5
1.1. Klimatuppvärmningens betydelse för vinterförhållanden vid nordliga breddgrader	5
1.2. Vinterförhållandenas betydelse för vintergröna växter	6
1.3. Lupinens inverkan på den omgivande växtligheten	7
1.4. Mesokosmexperimentet	9
1.5. Klorofyllfluorescensanalys; princip och ekofysiologisk betydelse	9
1.5.1. Klorofyllfluorescens hos mörkeradapterade blad – Fv/Fm	10
1.5.2. Fluorescensanalys i studien av ängsväxternas övervintring	11
1.6. Pigmenthalter hos ängsväxterna i mesokosmerna	12
1.6.1. Klorofyllhalter	12
1.6.2. Icke-fotosyntetiska pigment; anthocyanin och flavonol	13
1.7. Målsättningar med projektet	14
<b>2. Material och metoder</b>	14
2.1. Vinterförhållanden på övervintringsorterna	14
2.2. Experimentets upplägg	16
2.3.1. Mätapparatur	19
2.3.2. Mätningar	20
2.4. Statistisk analys	22
<b>3. Resultat</b>	23
3.1. Vinterförhållanden och ängsarternas övervintring i mesokosmerna	23
3.2.1. Årlig dynamik i klorofyllfluorescensen; Fv/Fm hos ängsväxterna i mesokosmerna	24
3.2.2. Inverkan av lupin och övervintringsort på Fv/Fm	25
3.3. Inverkan av lupin och övervintringsort på ängsarternas halter av klorofyll och flavonoider	28
3.3.1. Klorofyll	28
3.3.2. Flavonol	32
3.3.3. Anthocyanin	34
3.4. Lupinernas tillväxt och blomning	36
<b>4. Diskussion</b>	38
4.1. Ängsarternas Fv/Fm	38
4.2. Effekten av övervintringsförhållanden på klorofyllhalter hos ängsväxterna	39
4.3. Lupinens inverkan på klorofyllhalter och Fv/Fm hos ängsväxterna	40
4.4. Effekten av övervintringsförhållanden och lupinen på ängsväxternas flavonoidkoncentrationer	43
4.5. Övriga effekter av lupinens närvaro på ängsväxterna	46
4.6. Mesokosmexperimentets inverkan på lupinens tillväxt och pigmenthalter	47
<b>5. Slutsatser</b>	48
<b>6. Tack</b>	49
<b>7. Källor</b>	49

## 1. Introduktion

### 1.1. Klimatuppvärmningens betydelse för vinterförhållanden vid nordliga breddgrader

Enligt klimatprognoserna förväntas medeltemperaturen i jordens nordliga regioner stiga mer än det globala medeltalet till följd av en mångfald biogeokemiska återkopplingsmekanismer vars gemensamma verkan kollektivt har benämnts ”arktisk förstärkning” (eng. *arctic amplification*)(Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP), 2017). Vidare kommer denna uppvärmning att uttryckas kraftigare under vinterhalvåret (Kellomäki m. fl., 2010).

Mikkonen m. fl. (2015) rapporterade att temperaturen i Finland har stigit med  $2,3 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$  mellan 1847 och 2013 vilket är ungefär dubbelt mera än den globala temperaturökningen under samma tidsperiod. Den observerade ökningen gällde särskilt för temperaturer under vintern, medan temperaturökningen under sommaren var mindre tydlig enligt modellen (Mikkonen m. fl., 2015).

Kellomäki m.fl. (2010) beräknade att en uppvärmning på  $4^{\circ}\text{C}$  fram till slutet av det pågående århundradet kan leda till att perioden med bestående snötäcke i de södra och mellersta delarna av Finland kommer att förkortas med upp till 30 %. Vidare beräknades snötäckets medeldjup i regionen minska med ungefär hälften, från nuvarande ca 40 cm till ca 20 cm under samma tidsperiod (Kellomäki m. fl., 2010). Förutom att snötäcket blir tunnare förväntas det också bli mer efemärt (Kellomäki m. fl., 2010). Ett bestående snötäcke under hela vintern förväntas således bli mera sällsynt i framtiden. Snarare förmodas att snötäcket kommer att smälta och återbildas flera gånger under vintersäsongen.

Nederbörsmönstren under vintersäsongen kommer att förändras (Jylhä m. fl., 2007). Enligt klimatmodellerna kommer nederbörden under vintern att öka, men kommer i högre grad att falla i form av regn istället för snö. Frekvensen av dagar då temperaturen under vintern korsar nollstrecket (eng. *freezing point days*) i någondera riktningen kommer att öka (Jylhä m. fl., 2007).

Extrema temperaturfluktuationer under vintern har redan blivit vanligare (Bokhorst m. fl., 2008). Med dessa avses kortvariga milda perioder med plusgrader mitt i vintern följda av sträng kyla. Detta kan leda till att snötäcket lokalt smälter bort och marken börjar tina för att sedan snabbt åter frysa.

## 1.2. Vinterförhållandenas betydelse för vintergröna växter

Växter i nordliga regioner är anpassade till stränga vintrar. Ettåriga arter undviker den kalla säsongen genom att övervintra som frö och många fleråriga arter övervintrar med hjälp av sina underjordiska delar. För marknära vintergröna växter som bibehåller ovanjordiska gröna delar under vintern är snötäckets isolerande effekt av avgörande betydelse för övervintringen (Kreyling, 2010; Bokhorst m. fl., 2011). Under snötäcket undviker marknära växter därmed de stränga lufttemperaturer som ofta råder under vintern. I en vinterstudie av lingon (*Vaccinium vitis-idaea*) observerades att marktemperaturen under snötäcket aldrig sjönk under  $-9^{\circ}\text{C}$  och vidare hölls bladens temperatur under dagen runt  $0^{\circ}\text{C}$  trots att lufttemperaturen tidvis var betydligt kallare (Starr & Oberbauer, 2003). Ifall snötäcket smälter bort till följd av en plötslig mild period i mitten av vintern kommer marknära vintergröna växter således att vara oskyddade då luften åter kyls ned, och kan då ådra sig frostsador.

Frost-smält-cykler (eng. *freeze-thaw-cycles*) kan leda till att smältvatten från snön snabbt fryser åter och då kan växter inkapslas i solid is. Is saknar snöns isolerande egenskaper och skyddar därmed inte växterna mot kyla. Dessutom förhindras gasutbyte, vilket med tiden leder till syrebrist vilket orsakar växterna ytterligare skada (Andrews, 1996).

Vintergröna arter i fältskiktet kan upprätthålla sin fotosyntetiska kapacitet på vintern under snötäcket. Detta har påvisats för ett flertal allmänt förekommande arter som lingon (Lundell m. fl., 2011) samt för exempelvis smultron (*Fragaria vesca*), vårfryle (*Luzula pilosa*) och blåsippa (*Hepatica nobilis*), (Åström m. fl. 2012). Kapaciteten för fotosyntes hos lingonet är dock betydligt lägre under vintern än under sommaren och hösten (Saarinen m. fl., 2011). Ändå är fotosynteskapaciteten under vintern i princip fördelaktig i och med att arten då är i beredskap att starta assimilationen ifall våren skulle anlända tidigt.

I en studie där lingonplantor utsattes för kalla temperaturer och sedan flyttades in i tillväxtkammare där temperaturen var  $+3^{\circ}\text{C}$  påvisades att arten snabbt kan återuppta hög fotosyntetisk kapacitet (uppmätt i  $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$ ) i milda temperaturer (Saarinen m. fl., 2011). Efter en åtta dagars återhämningsperiod uppnådde de plantor som före flytten utsatts för  $-14^{\circ}\text{C}$  dock bara ungefär hälften av den kapacitet som uppmättes hos plantor som utsatts för  $-5^{\circ}\text{C}$  före flytten. Resultaten antyder att exponering för stränga temperaturer under vintern kan påverka växternas fotosyntetiska kapacitet under följande tillväxtsäsong.

Förutom att växter utsätts för stränga temperaturer kan frånvaro av ett snötäcke innebära att vintergröna växter utsätts för höga ljusnivåer under våren. Ifall marken är frusen och temperaturen begränsar koldioxidfixeringen kan det här leda till fotoinhibition där fotosyntesmaskineriet tar skada (Lundell m. fl., 2010), samt till uttorkning ifall växter transpirerar men inte kan ta upp vatten då marken är frusen (Sevanto m. fl., 2011).

Klimatuppvärmningen förväntas leda till en längre tillväxtsäsong i Europa och modeller baserade på fenologiska tidsserier av lövsättningen hos träd visar att vintern idag inträder ca 5 dagar senare än under 1960-talet, samtidigt som våren i medeltal kommer ca 6 dagar tidigare (Menzel & Fabian, 1999). Kreyling (2011) påpekar dock att trots att luftens medeltemperatur under vintern kommer att öka så är det den marknära temperaturen, och särskilt den kortsiktiga dynamiken i denna, som är av avgörande betydelse för en framgångsrik övervintring hos fältskiktets växter i nordliga områden. I samband med en längre tillväxtsäsong förväntas primärproduktionen öka (Menzel & Fabian, 1999), men till följd av ovannämnda förändringar i vintersäsongens karaktär är det oklart hur växtsamhällen i nordliga områden kommer att reagera och i vilken grad de kan dra nytta av en längre tillväxtsäsong.

### 1.3 Lupinens inverkan på den omgivande växtligheten

Blomsterlupinen (*Lupinus polyphyllus*, Fabaceae) är en flerårig ärtväxt som ursprungligen härstammar från västra Nordamerika (Valtonen m. fl., 2006). Då arten beskrevs 1827 hade den redan spridits till Europa och på 1960-talet förvildades den som trädgårdsrymling i Finland. Därefter har den ytterligare spridit sig norrut ofta längs vägrenar där den aggressivt etablerat sig i stora bestånd (Valtonen m. fl., 2006). Som flerårig och relativt storvuxen kan arten effektivt konkurrera om utrymme och resurser på bekostnad av småvuxna ängsarter som funnit refugier på de öppna vägrenarna sedan det traditionella jordbrukets betesängar minskat (Pykälä, 2001). Tack vare sin förmåga att fixera atmosfäriskt kväve med hjälp av rotnölar har arten en ytterligare konkurrensfördel i dylika näringsfattiga biotoper (Ramula & Pihlaja, 2012).

Studier har visat att kärlväxternas diversitet minskat på platser som invaderats av lupinen (Valtonen m. fl., 2006; Ramula & Pihlaja, 2012). Särskilt bland småvuxna arter (<20 cm) var artantalet och täckningsgraden lägre medan täckningsgraden för storvuxna arter inte förändrades signifikant. Detta tyder på att lupinens skuggande inverkan är av särskild betydelse (Valtonen m. fl., 2006). Vidare visade NMS-ordinationsanalys (eng. *non-metric multidimensional scaling*) att lupininvaderade



växtsamhällen har en mera homogen artsammansättning än lupinfria växtsamhällen där artsammansättningen var mera varierande (Valtonen m. fl., 2006).

Ramula & Pihlaja (2012) observerade alltså en minskad diversitet bland kärlväxter på lupininvaderade platser, men märkte samtidigt att frösättningen hos ängsarterna ökade i närvaro av lupinen. Forskarna påpekade dock att ökad fekunditet inte nödvändigtvis innebär ökad fitness om man beaktar växternas hela livscykel eftersom groning och tillväxt kan försvåras av brist på utrymme, skuggning, samt av eventuell allelopatisk inverkan av lupinen (Ramula & Pihlaja, 2012).

Trots att lupinen har påvisats vara en hård konkurrent till ängsarter har det även observerats att arter som växer i närheten av kvävefixerande arter kan dra nytta av det kvävetillskott de tillför jordmånen (Temperton m. fl., 2007). Detta tillskott är delvis en följd av direkt deponering av kväve från den kvävefixerande arten till rhizosfären via rötterna, och delvis tillförs kvävet jordmånen då det mineraliseras vid nedbrytning av växtdelar (Temperton m. fl., 2007). Vidare anses den atmosfäriska fixeringen öka då kvävefixerande arter växer tillsammans med icke-fixerande arter eftersom icke-fixerande arter ofta konkurrerar effektivt om kvävet i jordmånen (Xiao m.fl., 2004). Detta leder till att den fixerande arten måste reglera upp den atmosfäriska fixeringen, vilket i sin tur leder till en ökad total input av kväve i systemet (Xiao m.fl., 2004).

Artinvasioner är ofta associerade med störningar i ekosystem (Richardson m. fl., 2007). Effekterna kan vara svårt att utröna ifall man betraktar en plats där en invasiv art etablerat sig för länge sedan eftersom man inte känner till situationen innan den anlände. Likväl kan effekterna vara svåra att observera också vid nya invasioner, på grund av fördröjd respons hos växtsamhällen (Richardson m. fl., 2007). Lupinens inverkan på vägrenarnas växtlighet är väl belagd, men mindre är känt om hur dess invasion av naturliga habitat framskrider.

Klimatförändringen rubbar mönstren i vintersäsongens temperaturer och nederbörd vilket förmodligen kommer att ha negativa effekter för växtligheten som är anpassad till kalla och snörika vintrar. Det här väcker frågan om huruvida dessa störningar kommer att underlätta etableringen och spridningen av främmande arter som lupinen då de ursprungliga arternas övervintring försvåras. Likaledes är det tänkbart att lupinens egen övervintring försvåras på grund av de utmaningar som förändrade vinterförhållanden medför.

#### **1.4. Mesokosmexperimentet**

Med mesokosmstudier avses olika tekniker för att studera avgränsade ekologiska system under semi-naturliga förhållanden. Jämfört med fältstudier möjliggörs en hög grad av kontroll över experimentets utgångspunkter. Samtidigt ger mesokosmstudier möjligheten att i ett experiment utnyttja naturliga behandlingar som är svåra eller omöjliga att simulera i laboratorium (Odum, 1984; Stewart m. fl., 2013).

I detta experiment utgjordes mesokosmerna av 36 odlingslådor i vilka konstgjorda växtsamhällen anlades. Tolv olika naturligt förekommande ängsarter planterades från frö i mesokosmerna på våren 2016 i Vik i Helsingfors. Således erhöles sinsemellan homogena och enkelt portabla modellsystem av ängsvegetation. På våren 2017 planterades en lupin per odlingslåda i hälften av mesokosmerna för att undersöka artens kortsiktiga inverkan på vegetationen i modellsystemen. Fördelarna med upplägget var att skillnader i artsammansättning, edafiska faktorer samt lokal historia som skulle förekomma mellan provytor i en fältstudie av naturliga ängsbiotoper kunde elimineras.

Mesokosmerna utsattes för kontrasterande övervintringsbehandlingar. Hälften flyttades till Lampis biologiska station i Tavastehus medan andra hälften flyttades till Nåtö biologiska station på Åland över vintern 2017-18. På våren 2018 fördes alla mesokosmer tillbaka till Helsingfors. Således skiljde sig mesokosmernas förhållanden från varandra enbart under vintern medan förhållandena under den egentliga tillväxtsäsongen var samma för alla. Vintern på Åland är betydligt mildare och snöfattigare än vintern i Tavastehus och fick därmed representera den typ av vinter som förväntas råda på fastlandet i framtiden då klimatuppvärmningen fortskridit. Vintern i Tavastehus är kallare och snötäcket består vanligen under hela vintern. Därmed motsvarade denna behandling de förhållanden som ängsväxterna är anpassade till. Fördelen med experimentets upplägg var här att olika grupper av mesokosmer kunde utsättas för komplexa övervintringsbehandlingar inbegripande de olika orternas naturliga dynamik i vintertidens nederbörd och temperatur som inte skulle vara möjliga att återskapa på konstgjord väg. Under experimentets gång mättes klorofyllfluorescensen samt pigmenthalterna i växternas blad upprepade gånger med hjälp av optiska mätapparater. Undersökningen av vinterförhållandenas och lupinens påverkan på ängsväxterna baserade sig på dessa mätningar.

#### **1.5. Klorofyllfluorescensanalys; princip och ekofysiologisk betydelse**

Principen bakom klorofyllfluorescensanalys är att ljusenergi som absorberas av klorofyllet i fotosystem II (PSII – ljusabsorberande proteinkomplex med talrika pigmentmolekyler på

kloroplasternas thylakoidmembraner) kan föras vidare på tre olika sätt: Genom fotokemi (energin används för fotosyntes), värmedissipering (energin avges som värme), eller klorofyllfluorescens (klorofyllmolekyler avger energin som ljus av längre våglängder) (Maxwell & Johnson, 2000; Murchie & Lawson, 2013). Dessa olika vägar konkurrerar sinsemellan om den absorberade ljusenergin, vilket betyder att förändringar i klorofyllfluorescensen avspeglar förändringar i fotosyntesrater och/eller värmedissiperingen (Maxwell & Johnson, 2000). En relativ ökning i fotosyntesraten kommer i sin tur att minska mängden fluorescens och värmedissipering eftersom en större andel av den absorberade energin används för fotokemi. Likaledes kommer en relativ ökning i värmedissiperingen att minska effekten av de två andra vägarna. Dessa fenomen har ur en fluorescensanalytisk synvinkel benämnts fotokemisk dämpning (då fotosyntesen ökar), samt icke-fotokemisk dämpning (då värmedissiperingen ökar) eftersom båda resulterar i att fluorescenssignalen dämpas (Baker, 2008; Murchie & Lawson, 2013).

#### **1.5.1. Klorofyllfluorescens hos mörkeradapterade blad – Fv/Fm**

För att fotosyntesen skall kunna fortskrida krävs att elektroner som exciteras i reaktionscentra hos PSII kontinuerligt förs vidare i elektrontransportkedjan som förser fotosystem I (PSI) med elektroner. Elektronacceptorn plastokinon (QA) som är belägen vid reaktionscentra i PSII kan i reducerat tillstånd inte ta emot en ny elektron förrän den oxiderats dvs. förrän elektronen förts vidare nerströms i elektrontransportkedjan. I detta tillstånd sägs PSII vara ”stängt” eftersom det inte kan fortsätta förse fotosyntesmaskineriet med elektroner. Då QA är i oxiderat tillstånd och i beredskap att ta emot elektroner från reaktionscentra i PSII sägs PSII vara ”öppet”.

I ett mörkeradapterat blad är fotosyntesmaskineriet tillfälligt avaktiverat (exempelvis på natten). Inga elektroner exciteras i reaktionscentra och alla PSII är antagningsvis öppna (Stirbet, 2011). Ingen ljusinducerad värmedissipering sker då heller, eftersom ingen ljusenergi absorberas av bladet (Murchie & Lawson, 2013). Genom att nu applicera en ljuspuls som är för svag för att separera elektroner från reaktionscentra (dvs. driva fotosyntes) kan den minimala fluorescensen ( $F_0$ ) som återges av klorofyllet i PSII mätas (Baker, 2008). Om man därefter applicerar en kraftig saturerande ljuspuls kommer elektroner omedelbart att exciteras i reaktionscentra, alla QA kommer att reduceras, och alla PSII kommer att stängas (Baker, 2008; Murchie & Lawson, 2013). Eftersom belysningstiden är kort (~1 s) hinner varken fotosyntesen eller värmedissiperingen regleras upp och därför avges ljusenergin som absorberats enbart i form av fluorescens från stängda reaktionscentra, utan att dämpas av vare sig fotokemiska eller icke-fotokemiska processer (Lawson m. fl., 2012). I detta ögonblick kan därför den maximala fluorescensen ( $F_m$ ) från PSII mätas (Maxwell & Johnson,

2000; Lawson m. fl., 2012; Murchie & Lawson, 2013). Parametrarna  $F_o$  och  $F_m$  avser specifikt minimal samt maximal fluorescens respektive hos mörkeradapterade blad. Hos ljusadapterade blad är fotosyntesapparaten aktiverad, vilket innebär att transportraten för elektronerna är hög och merparten av den absorberade ljusenergin utnyttjas för fotokemi vilket minskar den maximala fluorescensen (Murchie & Lawson, 2013). Fluorescensparametrar för ljusadapterad fotosyntes behandlas inte vidare i denna avhandling.

Skillnaden mellan  $F_o$  och  $F_m$  utgör den variabla fluorescensen  $F_v$  dvs. andelen av den absorberade ljusenergin som potentiellt kunde användas för fotokemi. Den variabla fluorescensens dividerad med den maximala fluorescensen  $F_v/F_m$  uttrycker således den potentiella maximieffekten med vilken PSII kan utföra fotokemi (Baker, 2008). Blad på ostressade växter har vanligen  $F_v/F_m$ -värden nära det teoretiska max-värdet på ca. 0,83 (Baker, 2008).

Stressfaktorer som kyla, torka och fotoinhibition kan leda till sänkt fotsynteseffekt samt långvarigt sänkta nivåer av  $F_v/F_m$ . Denna parameter kommer i sådana fall inte att återbördas till sin maximala nivå efter en natt eller en kortare mörkerperiod. I allmänhet anses denna nedreglering bero på att växter behöver gardera sig mot ett överskott av ljusenergi ifall det fysiologiska tillståndet på grund av stress inte tillåter adekvat assimilering, exempelvis då höga ljusnivåer råder vid kalla temperaturer (Lawson m. fl., 2012). Vid dylika förhållanden omjusteras det fotosyntetiska maskineriet långsiktigt för att avleda överlopps ljusenergi. Mekanismerna för detta är många, men exempelvis kan värmedissiperingen regleras upp långsiktigt (icke fotokemisk dämpning), vilket sänker den maximala fluorescensen  $F_m$  och därmed även  $F_v/F_m$  (Baker, 2008). Långvarig sänkning av  $F_v/F_m$  hos växter till följd av stressfaktorer är ett så allmänt observerat fenomen att det ofta använts som en generell indikator på att växter upplevt stress (Logan m.fl., 2007; Baker, 2008).

### **1.5.2. Fluorescensanalys i studien av ängsväxternas övervintring**

Långvarigt sänkta nivåer av  $F_v/F_m$  tyder på nedreglering av aktiviteten hos PSII eller på betydande fotoinhibition som en följd av ex. höga ljusnivåer, vilket kan leda till direkt skada på PSII (Murchie & Lawson, 2013). Parametern ger därmed direkt information om tillståndet hos fotosyntesens ljusreaktioner i ett givet blad, men inte om de facto fotosyntesrater definierade som mängden assimilerat kol per antal absorberade fotoner. Det har dock visats att  $F_v/F_m$  korrelerar nära med assimileringsrater av koldioxid och därmed kan parametern även användas som en indirekt indikator på växters fotosyntetiska kapacitet (Logan m.fl., 2007).



I denna studie användes fluorescensanalys för att undersöka huruvida fotosynteskapaciteten hos olika ängsarter påverkas olika av kontrasterande vinterförhållanden. Ålands snöfattiga vinter innebär kalla och ljusintensiva förhållanden som eventuellt kunde avspeglas i sänkta nivåer av Fv/Fm hos de växter som övervintrade där, jämfört med de växter som övervintrade i Tavastehus under ett tjockt snötäcke som skyddade dem från sträng kyla och starkt ljus. Studien försökte utreda huruvida en eventuell relativ sänkning av Fv/Fm hos de växter som övervintrat på Åland skulle kunna observeras vid mätomgångarna följande vår och sommar dvs. ifall svåra vinterförhållanden skulle påverka växternas fotosynteskapacitet negativt under följande tillväxtsäsong.

### **1.6. Pigmenthalter hos ängsväxterna i mesokosmerna**

I samband med mätningarna av ängsväxternas klorofyllfluorescens mättes även klorofyllhalter, samt halter av epidermala anthocyaniner och flavonoler. Dessa är icke-fotosyntetiska pigment som hör till en stor grupp av sekundärmetaboliter i växter som kollektivt benämns flavonoider (Buchanan m. fl., 2015). Pigmenthalterna mättes för att få en mer detaljerad bild av hur ängsväxterna påverkades av övervintringsförhållanden och lupinens närvaro, än vad som kunde erhållas av uppmätta Fv/Fm-värden. Dessa ger nämligen enbart direkt information om den operativa effekten hos fotosyntesens ljusreaktioner, och inte om klorofyllhalt. I likhet med klorofyllfluorescensen uppmättes pigmenthalterna icke-destruktivt med hjälp av optisk mätapparatur.

#### **1.6.1. Klorofyllhalter**

Klorofyllhalten hos ängsväxterna mättes för att undersöka huruvida olika övervintringsförhållanden skulle påverka klorofyllhalten olika hos de växter som övervintrade i Lampis och på Åland. Wang m. fl. (2016) observerade en lägre klorofyllhalt i höstvet (*Triticum aestivum*) hos plantor som utsatts för intensiv köldstress jämfört med ostressade plantor. Sänkningen förmodades bero på vävnadsskador som växterna ådrog sig i kylan. Ängsväxterna som övervintrade på Åland kunde eventuellt uppvisa en lägre klorofyllhalt under våren jämfört med Lampisväxterna, eftersom dessa utsattes för svårare köldstress i och med avsaknaden av ett bestående snötäcke.

Det är känt att kvävetillgången påverkar klorofyllhalten i bladen hos växter. Tillskott av kväve kan leda till ökad klorofyllhalt, medan kvävebrist kan minska denna (Peng m. fl., 1996; Guidi m.fl., 1997). I egenskap av en kvävefixerande art kunde lupinen tänkas tillföra kväve till de mesokosmer där den växte. Hypotetiskt sett kunde detta kväve komma de andra ängsarterna till godo då

experiment har visat att kväve kan överföras från kvävefixerande arter till andra arter som växer bredvid, både direkt via rotutsöndringar, samt indirekt via nedbrytning av rotdelar hos den kvävefixerande arten (Shen & Chu, 2004; Xiao m. fl., 2004). Eventuellt kunde detta kvävetillskott också ta sig uttryck i högre klorofyllhalter hos ängsarter som växte tillsammans med en lupin jämfört med dem som växte i lupinfria mesokosmer.

### **1.6.2. Icke-fotosyntetiska pigment; anthocyanin och flavonol**

Anthocyaniner och flavonoler är grupper av pigment som inte direkt deltar i fotosyntesen, men absorberar ljus. Anthocyaninerna absorberar i de gula och gröna våglängderna medan flavonolernas absorptionsmaximum ligger i det ultravioletta området av ljusspektret (Neill, 2001; Rapantova m. fl., 2016). Tack vare sina optiska egenskaper ger pigmenten upphov till blåviolettera och röda färger som återfinns i blommor, frukter och blad, där de anses utföra en mångfald uppgifter (Samanta m. fl., 2011). Relevant för denna studie var att flavonoider i bladens epidermis i allmänhet anses spela en viktig roll i växternas fotoprotektion dvs. de skyddar växterna mot allt för kraftigt ljus som orsakar fotoinhibition och kan skada fotosyntesapparaten (Steyn m. fl., 2002). Flavonoidernas fotoprotektiva egenskaper grundar sig i första hand på deras förmåga att absorbera ljus. Pigmenten har en avskärmade effekt i och med att de absorberar en del av den ljusenergi som träffar växtens vävnader och dissiperar denna på för växten ofarliga sätt. Därmed besparas själva fotosyntesapparaten den ljusstress som annars kunde orsaka foto-oxidation av viktiga proteinkomplex (Edreva, 2005). Utöver denna avskärmningseffekt fungerar anthocyaninerna som effektiva antioxidanter samt som ”uppfångare” av reaktiva syreformer som uppstår till följd av bl. a. foto-oxidation. Därmed hjälper de till med att minska den skada som uppstår till följd av ljusstress (Gould, 2004).

Dynamisk cellspecifik syntes av flavonoider sker i vävnader som utsätts för ljus. När de ljusintensiva förhållandena avtar börjar pigmenten brytas ner igen (Edreva, 2005). Förutom av ljus, ökar syntesen av flavonoider även av andra abiotiska stressfaktorer som exempelvis kyla och torka (Edreva, 2005; Steyn m. fl., 2002). Detta har väckt frågor om huruvida dessa föreningar uppfyller andra skyddsfunktioner, vid exempelvis köldtolerans, förutom ljusrelaterade sådana (Gould, 2004). En komparativ studie av olika mutanter av backtraven (*Arabidopsis thaliana*) med olika förmåga att syntetisera flavonoider kunde dock inte påvisa klara samband mellan flavonoidhalter och fysiologisk köldtolerans (Schulz m.fl., 2016). Flavonoidernas direkta påverkan på köldtoleransen hos växter är således tills vidare oklar. En möjlig förklaring är att andra stressfaktorer än ljus kunde fungera som signal för växter att öka produktionen av dessa föreningar eftersom t.o.m. moderata

ljusnivåer kan vara för höga för fotosyntesmaskineriet, ifall stressfaktorer såsom kyla eller torka i övrigt minskar växternas förmåga att assimilera energin (Steyn m. fl., 2002).

I experimentet mättes halterna av anthocyaniner och flavonoler för att undersöka huruvida dessa skulle påverkas av de olika ljus- och temperaturförhållanden som råder på de olika övervintringsorterna under vintern. Hypotetiskt sett borde de växter som övervintrade på Åland uppvisa högre halter av dessa pigment på grund av de stränga och varierande temperaturerna, samt intensiva ljusnivåerna som råder nära marken jämfört med Tavastehus, där det djupa snötäcket skyddar marknära växter mot bådadera.

## **1.7. Målsättningar med projektet**

Målet med experimentet var att reda ut:

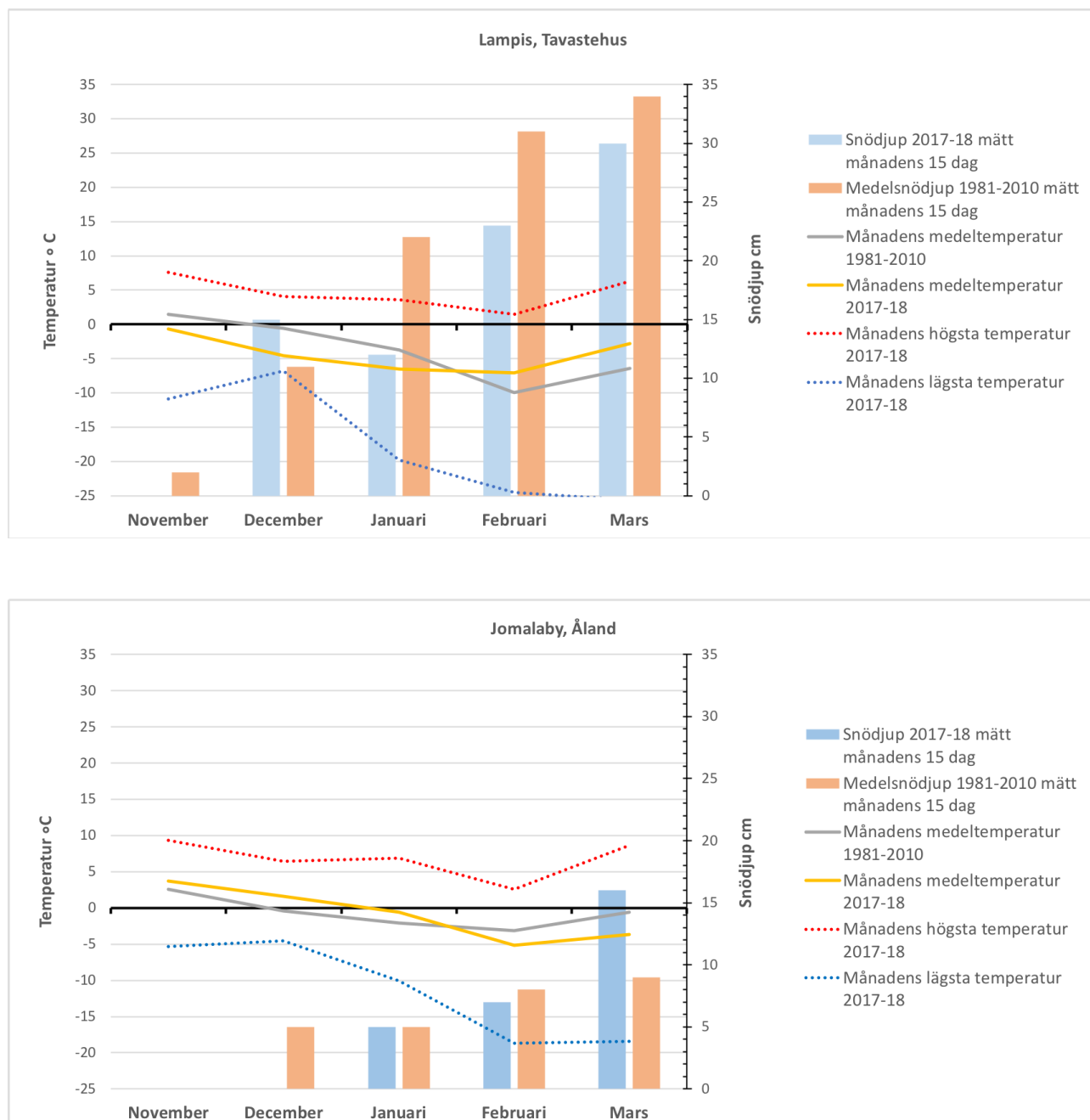
- i) Hur olika övervintringsförhållanden påverkar ängsarterna. Mer specifikt söktes svar på ifall Ålands varierande, och ur växternas synpunkt svårare vinterförhållanden skulle påverka ängsarterna negativt, och huruvida detta skulle avspeglas i bladens klorofyllfluorescens och pigmenthalter under början av tillväxtsäsongen.
- ii) Hur lupinens tillväxt påverkas av olika övervintringsförhållanden.
- iii) Hur lupinens närvaro påverkar omgivande ängsarter på kort sikt efter att den anlänt, och huruvida denna påverkan kan observeras i ängsarternas klorofyllfluorescens och pigmenthalter. Möjligtvis kunde det kvävetillskott som lupinen tillför avspeglas i en ökad klorofyllhalt samt högre nivå av Fv/Fm, eftersom detta tidigare observerats hos växter som respons på ökad kvävehalt (Peng m. fl., 1996; Shangguan m. fl., 2000).

## **2. Material och metoder**

### **2.1. Vinterförhållanden på övervintringsorterna**

Vinterförhållandena i Tavastehus och Åland skiljer sig betydligt vad beträffar snödjup och temperatur (bild 1). Vintern är i allmänhet kallare i Tavastehus och snötäcket är tjockare och mer bestående. På båda orterna fluktuerar temperaturen under våren betydande under dygnet. I Lampis ligger dygnets medeltemperatur dock i huvudsak under noll medan det på Åland är allmänt förekommande med plusgrader under denna tid. Vidare kvarstår i Lampi ett tjockt snötäcke långt in

på våren medan snötäcket på Åland är betydligt tunnare eller smälter bort helt. Den 22 mars 2018 då mesokosmerna hämtades från Lampis tillbaka till Vik var de täckta av uppskattningsvis 40 cm snö (bild 4). Den 27 mars hämtades mesokosmerna tillbaka från Åland och då var dessa helt snöfria (bild 5).



**Bild 1:** Månatliga medeltemperaturer och snödjup för vintern 2017-2018 samt 30 års månatliga medelvärden 1981-2010 från väderstationer i Lampis respektive Jomalaby. Källa: Meteorologiska institutet 2019



## 2.2. Experimentets upplägg

Studien utfördes i mesokosmer som bestod av 36 stycken odlingslådor av plast (40 x 30 x 15 cm). Dessa numrerades från 1 till 36 och fylldes med mull av låg näringsgrad (Niittymulta, *Kekkilä*, *Vanda*). I botten av lådorna gjordes hål för att överlopps vatten skulle kunna rinna bort. I alla mesokosmer planterades tolv ängsarter från frö på våren 2016. Lådorna delades in i 12 lika stora rutor och arterna planterades i slumpmässig ordning så att varje ruta innehöll en art. Arterna som användes i studien valdes för att de vanligen förekommer i sådana ängsbiotoper som finns i södra Finland. Vidare representerade urvalet av arter olika övervintringsstrategier (tabell 1) Fröna som användes var inköpta från ett företag (*AhonAlku ky. Helsingfors*) som samlat in dem från vilda populationer. De var insamlade i naturliga habitat på fastlandet och representerade således naturliga genotyper. Experimentet startades i Vik, Helsingfors.

**Tabell 1:** Ängsarter som användes i experimentet och deras övervintringsstrategier.

Art	Övervintring	Källa
<b>Backnejlika; <i>Dianthus deltoides</i></b>	Flerårig. En del av de marknära skotten övervintrar som gröna.	Egen observation.
<b>Bergsyra; <i>Rumex acetosella</i></b>	Flerårig. Små blad kan övervintra som gröna	Suuri kasvikirja vol. 2 (1965), egen observation.
<b>Blomsterlupin; <i>Lupinus polyphyllus</i></b>	Flerårig mha. robust huvudrot. Marknära bladprimordia kan övervintra.	Suuri kasvikirja vol. 2 (1965), egen observation.
<b>Fårsvingel; <i>Festuca ovina</i></b>	Flerårig. Flera blad i tuvan övervintrar som gröna	Egen observation.
<b>Harklöver; <i>Trifolium arvense</i></b>	Ettårig. Ifall fröet gror tidigt på våren blommar den samma sommar och vissnar sedan men ifall fröet gror på hösten kan plantan övervintra och blommar nästa sommar.	Suuri kasvikirja vol. 2 (1965), Pohjolan kasvit vol. 2 (1995), egen observation.
<b>Höstfibbla; <i>Leontodon autumnalis</i></b>	Flerårig, förmodligen mha. huvudrot. Enstaka blad kan övervintra som gröna	Pohjolan luonnonkasvit vol. 4 (1961), Suuri kasvikirja vol. 2 (1965), egen observation.
<b>Kattfot; <i>Antennaria dioica</i></b>	Flerårig. Vintergrön. Gör krypande utlöpare	Pohjolan kasvit vol. 3 (1995), egen observation.
<b>Rödclint; <i>Centaurea jacea</i></b>	Flerårig, förgrenad rot från vilka nya stjälkar växer. Blad kan övervintra som gröna.	Pohjolan luonnonkasvit vol. 4 (1961), egen observation.
<b>Smultron; <i>Fragaria vesca</i></b>	Flerårig, gör rotsläende utlöpare. Producerar på hösten en skild uppsättning vinterblad som övervintrar som gröna.	Pohjolan luonnonkasvit vol. 3 (1961), Suuri kasvikirja vol. 1 (1965), Åström m. fl. (2012), egen observation.

<b>Styvmorsviol; <i>Viola tricolor</i></b>	Oftast ettårig men kan vara två- eller flerårig. Enstaka blad kan övervintra ovan jord.	Pohjolan luonnonkasvit vol. 3 (1961), egen observation.
<b>Tjärblomster; <i>Lychnis viscaria</i></b>	Flerårig. Rosetter produceras från kort jordstam. Rosetten övervintrar som grön.	Pohjolan luonnonkasvit vol. 2 (1961), egen observation.
<b>Vitgröe; <i>Poa annua</i></b>	Ettårig/ibland övervintrande. Övervintrar som frö men blommar under milda år året om	Pohjolan luonnonkasvit vol. 2 (1961), egen observation.
<b>Ärenpris; <i>Veronica officinalis</i></b>	Flerårig. Vintergrön. Gör krypande rotsläende utlöpare. Under milda förhållanden kan huvudskottet växa under hela vintern.	Pohjolan luonnonkasvit vol. 2 (1961), Suuri kasvikirja vol. 3 (1965), Pohjolan kasvit vol. 2 (1995), egen observation.

Ängsarterna fick växa i mesokosmerna och övervintra i Helsingfors mellan våren 2016 och juni 2017 för att modellsystem av ängsvegetation skulle etableras. Inga mätningar gjordes under denna tid. Mesokosmerna vattnades regelbundet under experimentets gång med vatten från en trädgårdsslang men för att simulera en naturlig ängsbiotop tillsattes ingen näring.

Den 19.5.2017 planterades lupiner i hälften av mesokosmerna (totalt 18 st.). Lupinerna hade förgrots i en skild odlingslåda och planterades i mesokosmerna 3 veckor efter deras groning. Dessa unga plantor hade ännu inte hunnit producera synliga rotnölar. Varje lupin planterades i mitten av en låda så att deras närmast varande grannarter bestämdes av de andra arternas slumpmässiga placering i lådorna. Detta gjordes för att jämma ut effekterna av eventuell artspecifik växelverkan mellan lupinen och andra arter. Lupinfröna som användes var insamlade från förvildade lupiner i närheten av Vik 2016.

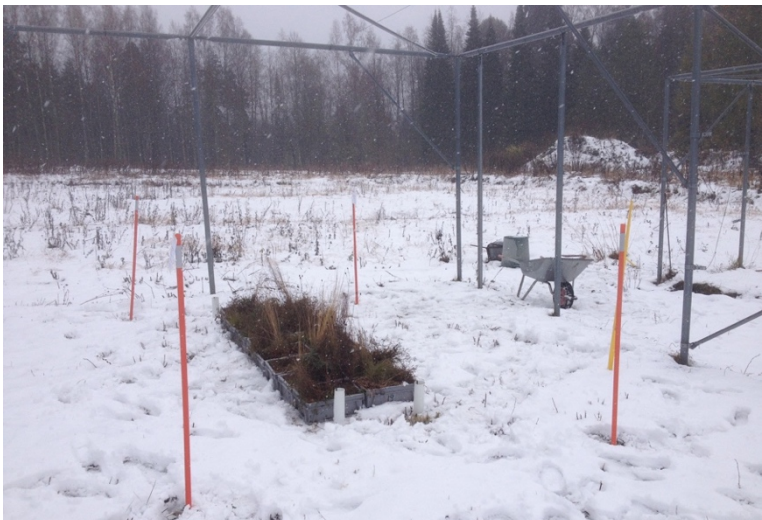
Den 25.5.2017 inventerades mesokosmerna. De flesta arter hade etablerat sig väl i mesokosmerna och återfanns i de rutor där de ursprungligen etablerats. Enstaka arter hade visserligen försvunnit ur ett fåtal enskilda mesokosmer, men överlag hade välartade växtsamhällen bildats.

*V. tricolor* och *T. arvense* hade försvunnit från de flesta mesokosmerna. Den 29 maj 2017 återplanterades frön av *V. tricolor* samt *T. arvense* i de mesokosmer från vilka de hade försvunnit. Dessa planterades i regel i den ruta där de ursprungligen funnits men ifall denna var övervuxen av andra arter planterades de på ett ställe i mesokosmen där det fanns ledig plats.

För de flesta lupinerna var tillväxten svag och de visade under sommarens gång tecken på att vissna. Den 17 augusti 2017 planterades därför nya lupiner som fått växa i samma separata låda

som de ursprungliga lupinerna förgrotts i. Dessa hade hunnit producera synliga rotknölar till skillnad från de ursprungliga lupinerna som ersattes i 15 av 18 mesokosmer.

Mellan den 29 och 31 oktober 2017 flyttades hälften (18 st.) av mesokosmerna till Lampis biologiska station i Tavastehus, och andra hälften till Nåtö biologiska station på Åland för övervintring (bild 2, bild 3). Här lämnades mesokosmerna över vintern och den sista veckan i mars 2018 flyttades alla mesokosmer tillbaka till Vik. På respektive övervintringsort placerades mesokosmerna i en samlad grupp på ett öppet ställe där ett snötäcke kunde bildas obehindrat av omgivande vegetation. Hälften av mesokosmerna på varje ort innehöll en lupin. Således kom experimentet att innefatta fyra olika behandlingar med nio mesokosmer per behandling: 18 mesokosmer som övervintrade på Åland (9 st. med lupin och 9 st. kontrollmesokosmer utan lupin), samt 18 mesokosmer som övervintrade i Lampis (9 st. med lupin och 9 st. kontrollmesokosmer utan lupin)



**Bild 2:** Den 29 oktober 2017 Fördes hälften av mesokosmerna till Lampis biologiska station i Tavastehus för att övervintra. Mesokosmerna övervintrade på fältet bredvid stationens gård



**Bild 3:** Den 30 oktober 2017 fördes hälften av mesokosmerna till Nåtö biologiska station på Åland för att övervintra. Mesokosmerna övervintrade på vallen mellan vägen och den biologiska stationens stenmur.



**Bild 4:** Lampis biologiska station den 22 Mars 2018. Dagen då mesokosmerna hämtades tillbaka till Vik. Vid avhämtningen var alla mesokosmer täckta av ett djupt snötäcke.



**Bild 5:** Nåtö biologiska station den 27 mars 2018. Dagen då mesokosmerna hämtades tillbaka till Vik. Vid avhämtningen hade snötäcket smultit bort.

### 2.3.1. Mätapparatur

Mätningar av växternas fluorescens utfördes med hjälp av tre olika apparater: PAM-2100 Klorofyllfluorometer (Heinz Walz, GmbH), Force A-Dualex Scientific+ (FORCE A, Orsay, Frankrike) och SPAD-502 (Konica Minolta, Europa).

PAM-2100 är en portabel klorofyllfluorometer utrustad med en optisk fiberkabel som kan applicera en aktinisk ljuspuls och registrera återgiven klorofyllfluorescens. Bladen som mättes mörkeradapterades i 20 minuter med hjälp av kyvetter som tillhör apparaten och designats för detta ändamål. Därefter gjordes mätningarna med ett av apparatens färdiga standardprogram (Run2) som



applicerar en för fotosyntesen saturerande ljuspuls och sedan registrerar ljusstyrkan av fluorescensen i de nära infraröda våglängderna som avges från exciterade klorofyllmolekyler i PS II (Murchie & Lawson, 2013)

Force A Dualex Scientific + är en apparat som mäter transmissionen av rött ljus och ultraviolett ljus genom ett blad som utsätts för snabba upprepade ljuspulser. Apparaten mäter även, i likhet med PAM-2100, fluorescensen från exciterade pigmentmolekyler. Ljuskällan och sensorn är båda inneslutna i en bladklämma som är ansluten till apparaten. En mätning utförs då man med klämman omsluter ett blad. På basis av uppmätt transmission samt re-emission gör Dualex-mätaren beräkningar och anger estimeringar av klorofyllhalt, flavonoidhalt och anthocyaninhalt. Dessa anges i form av indikatorvärden. (Goulas m. fl., 2004; Barthod m. fl., 2007; Cerovic m. fl., 2012)

SPAD-502 är i likhet med Dualex en apparat vars mätkammare är innesluten i en liknande bladklämma som hos Dualex-mätaren. Mätningar utförs på samma sätt som med Dualex. SPAD-apparatens mätningar grundar sig på klorofylllets absorbans av rött ljus som appliceras av apparaten. På basis av den relativa transmissionen av rött ljus (absorberas av klorofyll) jämfört med transmissionen av nära infrarött ljus (absorberas inte av klorofyll) genom bladet uppskattar apparaten bladets klorofyllhalt och anger denna som ett numeriskt indikatorvärde. (Xiong m. fl., 2015)

### **2.3.2. Mätningar**

För varje mätomgång gjordes med varje apparat två mätningar av olika slumpmässigt valda blad per art per mesokosm för att jämnat ut individuella skillnader mellan individer då samma blad och individ inte kunde mätas varje gång. Medeltalet av dessa två mätningar användes som mätvärde för en given art och låda. Om växterna var för småväxta eller ifall allt för få blad fanns tillgängliga för att två mätningar skulle kunna göras gjordes bara en mätning och detta värde användes. För att växterna skulle påverkas av mätningarna möjligast lite utfördes mätningar i huvudsak utan att bladen lösgjordes från växterna, men i vissa fall då endast väldigt små blad fanns tillgängliga avlägsnades dessa från växten för att mätas. Alla mätningar gjordes på bladets adaxiala sida. Mätningar gjordes med alla apparater vid sex tillfällen under hösten 2017 och våren 2018 (tabell 2). Styvmorsviolen, tjärblomstret, vitgröet samt harklövern hade vid experimentstarten i juni 2017 tillvuxit dåligt och nödvuxna individer återfanns bara i ett fåtal mesokosmer. Därför lämnades dessa arter bort ur experimentet.

**Tabell 2:** Datum för olika mätomgångar under experimentets gång.

Hösten 2017	Våren 2018
27 juni – 7 juli 2017	28 – 30 mars 2018
5 – 13 september 2017	30 april – 2 maj 2018
20 – 25 oktober 2017	27 juni – 4 juli 2018

Målet var att göra mätningar med relativt jämna tidsintervall (6-8 veckor) för att skapa en tidsserie av den årliga variationen i ängsväxternas klorofyllfluorescens och halter av klorofyll, flavonol samt anthocyanin. Under övervintringsperioden november 2017 till mars 2018 gjordes inga mätningar. I första hand uppskattades klorofyll- och pigmenthalter med Dualex-mätaren. Klorofyllhalten hos *R. acetosella* och *D. deltoides* uppskattades undantagsvis med SPAD-mätaren eftersom dessa arters blad var för små för att mätas med Dualex-mätaren. Mätningar gjordes på gröna blad. Alla arter mättes därför inte vid alla mätomgångar eftersom det till följd av de olika arternas specifika bladfenologi inte alltid fanns gröna blad att mäta på en given art. För en överblick av vilka arter som mättes under olika mätomgångar, och med vilka apparater se tabell 3.

**Tabell 3:** Översikt över vilka arter som mättes med vilka apparater under experimentets gång.

<b>PAM-2100</b>	27.6-7.7 17	5-13.9 17	20-25.10 17	28-30.3 18	30.4-2.5 18	27.6-4.7 18
Backnejlika	x	x	x	x	x	x
Bergsyra	x	x	x			x
Fårsvingel	x	x	x	x		x
Höstfibbla	x	x	x			x
Kattfot	x	x	x	x	x	x
Lupin		x	x			x
Rödklint	x	x	x			x
Smultron	x	x	x	x	x	x
Ärenpris	x	x	x	x	x	x
<b>Dualex</b>	6.7 17	12-13.9 17	25.10 17	30.3 18	7.5 18	2.7 18
Kattfot	x	x	x	x	x	x
Lupin		x	x			x
Rödklint	x	x				x
Smultron	x	x				x
Ärenpris	x	x	x		x	x
<b>SPAD</b>	7.7 17	13.9 17	25.10 17	30.3 18	7.5 18	4.7 18
Backnejlika	x	x	x	x	x	x
Bergsyra	x	x	x			x
Höstfibbla	x	x	x			x

Under hela experimentets gång mättes luftens temperatur vid mesokosmerna varje timme och bokfördes med hjälp av automatiserade temperaturloggers (*IButton: Maxim integrated, San Jose, Kalifornien, USA*). Dessa var fästa på pinnar som kördes ner i marken så att loggern befann sig på 10 cm höjd från marken. Runt varje logger placerades en cylinder av vit PVC-plast för att temperaturavläsningarna inte skulle påverkas av att loggern utsattes för direkt solstrålning.

Under våren och sommaren 2018 räknades antalet blad hos lupinerna vid fem tillfällen. Vidare noterades ifall lupinerna hade blommat och hur många blomställningar de producerat. Blad räknades med ifall de kunde identifieras som blad dvs. även små blad i början av sin utveckling räknades. Blad som vid en given tidpunkt hade vissnat räknades inte med. Den 16 juli 2018 räknades antalet blad och blomställningar för sista gången. Vid denna tidpunkt hade lupinerna slutat producera nya blad och blomställningar.

## 2.4. Statistisk analys

Datat analyserades med hjälp av variansanalys för upprepade mätningar (eng. *repeated measurements ANOVA*) – en version av variansanalys som är utformad för experiment där samma individer mäts upprepade gånger. Experimentet uppfyllde inte strikt taget kravet på att det skall vara samma individer som mäts varje gång eftersom olika blad och/eller stjälkar mättes vid olika mätomgångar men i experimentet behandlades en art i en given mesokosm i sin helhet som en individ.

I analysen behandlades de uppmätta värdena av fluorescensen som beroende variabler och de olika mätomgångarna som subjektiva faktorer (eng. *within-subject factor*, dvs. den beroende variabelns förändring över tiden). Tre oberoende variabler utgjordes av **i**) lupin (1 = närvarande i mesokosmen, 2 = frånvarande i mesokosmen), **ii**) övervintringsort (1 = Lampi, 2 = Nåtö), samt **iii**) ”behandling” som angav var mesokosmerna hade övervintrat samt ifall en lupin var närvarande eller frånvarande (1 = Lammi – ej lupin, 2 = Lammi – lupin, 3 = Åland – ej lupin, 4 = Åland – lupin).

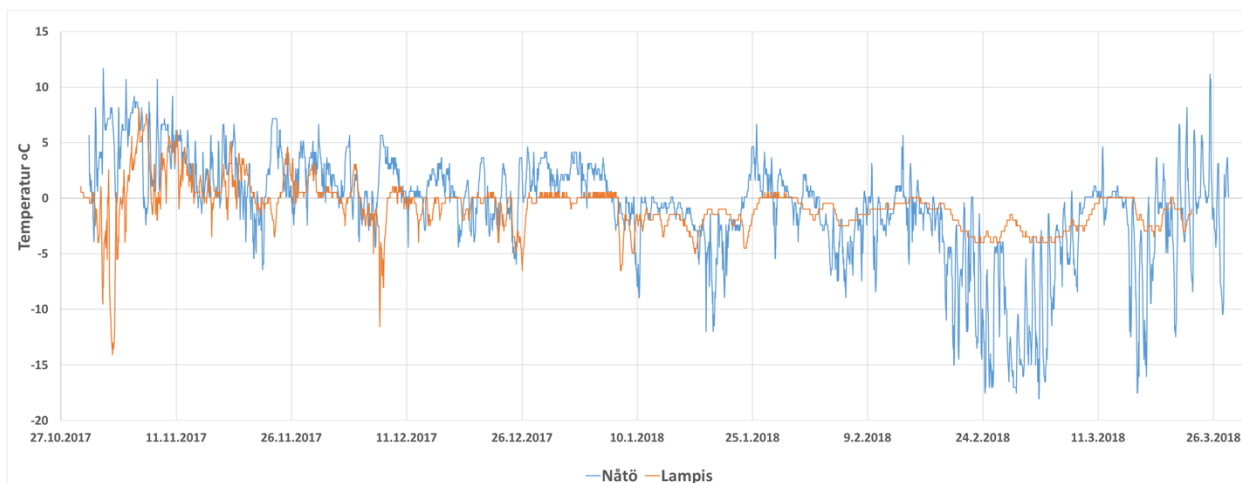
Variansanalysen för upprepade mätningar gjordes skilt för var och en av de tre oberoende variablerna för att utröna de relativa effekterna av övervintringsort och lupin, samt olika kombinationer av dessa. Samma analyser gjordes med datat från alla tre apparater. Förändringen i lupinernas blad- och blomantal under 2018 analyserades också med variansanalys för upprepade mätningar. Antal blad och blomställningar vid olika tidpunkter behandlades som subjektiva faktorer och övervintringsort som en oberoende variabel.

Analysen visar ifall det överlag finns signifikanta skillnader mellan medelvärden för uppmätt nivå av fluorescens mellan olika mätomgångar och mellan grupper av individer som utsatts för olika behandlingar. Analysen påvisar dock inte var dessa skillnader finns dvs. vilka specifika mätomgångars och behandlingars medelvärden som skiljer sig. Därmed måste vidare analyser göras för att precisera var signifikanta skillnader i medelvärden mellan olika behandlingar och mätomgångar förelåg. En visuell bedömning gjordes av graferna som variansanalysen för upprepade mätningar gav upphov till. På basis av denna bedömning analyserades iakttagna skillnader i medelvärden mellan specifika behandlingar och mätomgångar för att se ifall dessa skillnader var signifikanta. För fortsättningsanalysen användes envägs-variensanalys (eng. *oneway ANOVA*). För att analysera skillnader i nivåer av pigmenthalter och fluorescens hos en viss art mellan olika mätomgångar användes t-test för parade sampel (eng. *paired sample t-test*). Alla analyser gjordes med *IBM SPSS Statistics 25* (Armonk, New York, USA).

### **3. Resultat**

#### **3.1. Vinterförhållanden och ängsarternas övervintring i mesokosmerna**

Väderförhållandena på de olika övervintringsorterna skiljde sig märkbart från varandra under vintern 2017-18. I Lampis började snötäcket bildas i slutet av oktober och då mesokosmerna hämtades därifrån den 22. 3 2018 låg de täckta av ca 40 cm snö. Av detta att döma bibehölls snötäcket förmodligen under hela vintern. På Nåtö bildades under vintermånaderna bara ett tunt snötäcke och först i mars översteg medelsnödjupet 10 cm enligt meteorologiska institutets data från Jomalaby väderstation (Meteorologiska institutet, 2018). När mesokosmerna hämtades från Nåtö den 27.3 2018 hade snön helt smultit bort från mesokosmerna och deras omgivning. Vidare var växternas basala delar i dessa mesokosmer inbäddade i ett lager av is vilket inte var fallet i Lampis. Datat från temperaturloggarna visade att den marknära temperaturen på Nåtö fluktuerade betydligt särskilt under perioden januari – mars (bild 6). Som mest fluktuerade temperaturen under ett dygn med ca 20°C. I Lampis låg temperaturen konstant mellan 0 och -5°C under samma tidsperiod. Således motsvarade vinterförhållandena på orterna väl de kontrasterande övervintringsbehandlingar som experimentets plan förutsatte.

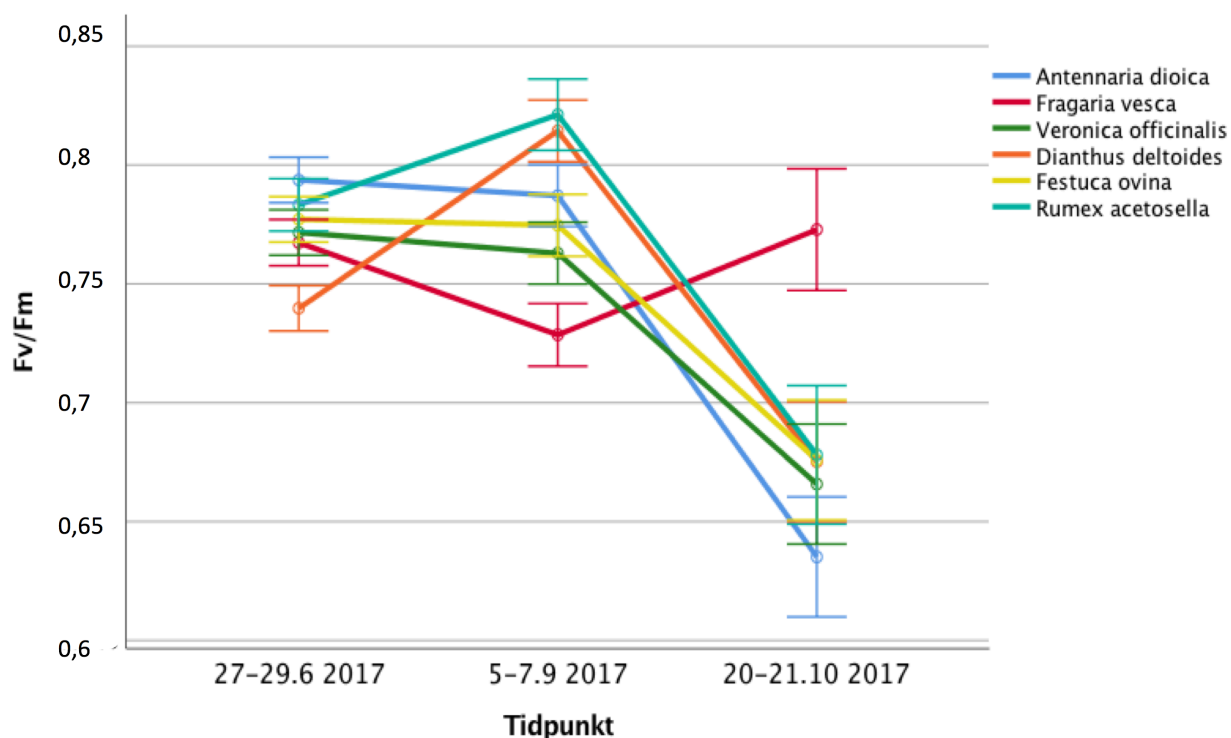


**Bild 6:** Temperatur 10 cm över marken i Nåtö och Lampis under perioden 27. 10 2017 – 27. 3 2018. Temperaturen registrerades automatiskt varje timme m.h.a. iButton temperaturloggers. Notera hur temperaturen på Åland fluktuerade kraftigt under våren i frånvaro av snötäcke. Jämförelsevis var temperaturen under samma tidsperiod relativt stabil i Lampis där snötäcket förhindrade både att plusgrader uppnåddes samt sträng kyla nära marken.

### 3.2.1. Årlig dynamik i klorofyllfluorescensen; Fv/Fm hos ängsväxterna i mesokosmerna

För *A. dioica*, *F. vesca*, *V. officinalis* och *D. deltoides* erhöles kompletta mätserier av klorofyllfluorescensen hos mörkeradapterade blad (härefter används benämningen Fv/Fm), eftersom dessa arter hade gröna blad vid alla mätomgångar. *L. autumnalis* uppvisade under våren 2018 svag tillväxt och hade till sommaren försvunnit ur de flesta mesokosmer. Därför lämnades arten bort ur analyserna eftersom sampelstorleken var för liten.

Artspecifika skillnader förekom i dynamiken hos ängsarternas Fv/Fm-nivåer under hösten (bild 7). *A. dioica*, *F. ovina* och *V. officinalis* hade samma eller något lägre nivåer av Fv/Fm i början av september som i slutet av juni 2017 medan *D. deltoides* och *R. acetosella* uppvisade högre nivåer i september jämfört med juni 2017. Alla dessa arter hade i oktober tydligt lägre nivåer än under sommaren och tidig höst. Fv/Fm sjönk i september hos *F. vesca* men steg sedan och låg i oktober åter nära sommarens nivåer vilket berodde på att nya vinterblad hade bildats. Sommarbladen hos *F. vesca* mättes juni och september 2017. För alla andra arter var oktobers nivåer av Fv/Fm lägre än septembers nivåer men överlag ännu relativt höga. Mätningarna i oktober utfördes dagen efter årets första nattfrost den 20. 10. 2017.



**Bild 7:** Förändringen i Fv/Fm under hösten 2017 enligt art hos ängsväxterna i mesokosmerna. Datan som visas för ängsarterna inbegriper både mesokosmer med och utan lupin. Felbalkar avser 95% konfidensintervall.

### 3.2.2. Inverkan av lupin och övervintringsort på Fv/Fm

Ängsväxternas nivåer av Fv/Fm uppmättes sista gången i mesokosmerna den 27-29.6 2018, ett år efter att de första mätningarna gjordes. Inga betydande skillnader framträdde i ängsarternas nivåer av Fv/Fm mellan mesokosmer som övervintrat på olika orter (bild 8). Under vårens mätningar (i mars och april) var skillnaderna mellan olika behandlingar mer variabla jämfört med nivåerna under sommaren men i inga fall var skillnaderna i Fv/Fm beroende på övervintringsort statistiskt signifikanta (tabell 4).

I slutet av juni 2018 uppvisade *C. jacea* högre nivåer av Fv/Fm i lupinförsedda mesokosmer överlag jämfört med mesokosmer utan lupin (envägs anova;  $p = 0,032$ ) (bild 8 G). Datan uppfyllde dock inte antagandet om homogen varians inom sampel (Levenes test; sig. = 0,02) och därmed kan p-värdet i detta fall vara underskattat. Arten hade högre nivåer av Fv/Fm i lupinförsedda mesokosmer från båda övervintringsorter jämfört med lupinfria men skillnaderna var inte statistiskt signifikanta då mesokosmer från olika övervintringsorter analyserades som enskilda grupper (envägs ANOVA;  $p = 0,132$  samt  $p = 0,119$  för Lampis och Nåtö respektive).

*F. vesca* uppvisade i slutet av april och i slutet juni 2018 något högre nivåer av Fv/Fm i mesokosmer som innehöll lupin från båda orter (bild 8 C), men skillnaden var inte statistiskt signifikant (tabell 1). *D. deltoides* hade högre Fv/Fm-nivåer i lupinförsedda mesokosmer från båda orter jämfört med lupinfria mesokosmer vid mätningarna i slutet av mars (bild 8 D), men skillnaden var inte statistiskt signifikant (tabell 1) och kvarstod inte vid mätningarna i juni 2018 då skillnaden i Fv/Fm-nivåer mellan lupinförsedda och lupinfria mesokosmer var obetydlig.

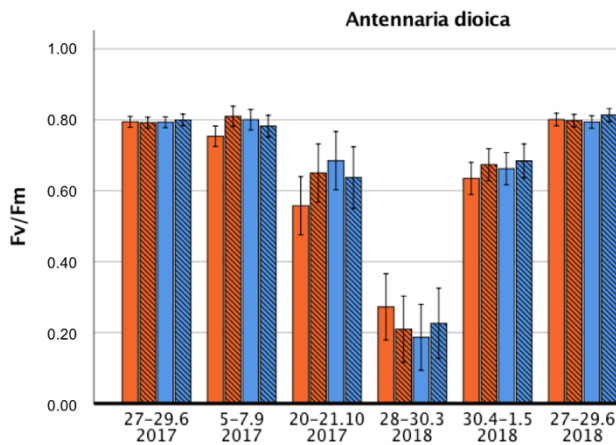
*V. officinalis* hade något högre nivåer av Fv/Fm i lupinfria mesokosmer från båda orter vid mätningarna i april-maj skiftet (bild 8 B) men skillnaderna var inte statistiskt signifikanta (tabell 4). Denna skillnad kvarstod inte vid mätningarna i juni 2018.

De övriga arterna uppvisade inga märkbara skillnader i deras nivåer av Fv/Fm beroende på vare sig närvaro/frånvaro av lupin eller övervintringsort (tabell 4, bild 8).

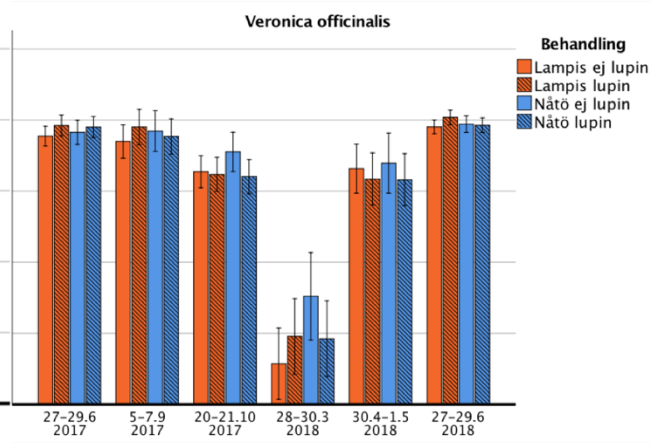
**Tabell 4:** Signifikansvärden enligt art för variansanalys för upprepade mätningar av ängsväxternas nivåer av Fv/Fm. I "lupin/ej lupin"-analysen jämförs enbart lupinens inverkan på Fv/Fm-nivåer hos ängsväxterna och inbegriper alla mesokosmer oberoende av övervintringsort (jämförelse av 2 grupper). "Övervintringsort"-analysen jämför Fv/Fm-värden hos ängsväxterna i mesokosmer som övervintrat på olika orter och inbegriper både lupinfria och lupinförsedda mesokosmer (jämförelse av 2 grupper). "Behandling"-analysen jämför samverkan av olika kombinationer av närvaro/frånvaro av lupin och övervintringsort (jämförelse av 4 grupper). För *C. jacea* var skillnaden mellan lupinförsedda mesokosmer och lupinfria mesokosmer statistiskt signifikant (utmärkt med asterisk i tabellen).

arter	lupin/ej lupin	övervintringsort	behandling
<i>A. dioica</i>	p = 0,278	P = 0,372	p = 0,460
<i>V. officinalis</i>	p = 0,842	p = 0,271	p = 0,160
<i>F. vesca</i>	p = 0,433	p = 0,381	p = 0,481
<i>D. deltoides</i>	p = 0,156	p = 0,836	p = 0,508
<i>F. ovina</i>	p = 0,705	p = 0,973	p = 0,929
<i>R. acetosella</i>	p = 0,800	p = 0,338	p = 0,684
<i>C. jacea</i>	p = 0,031 *	p = 0,822	p = 0,118
<i>L. polyphyllus</i>	-	p = 0,453	-

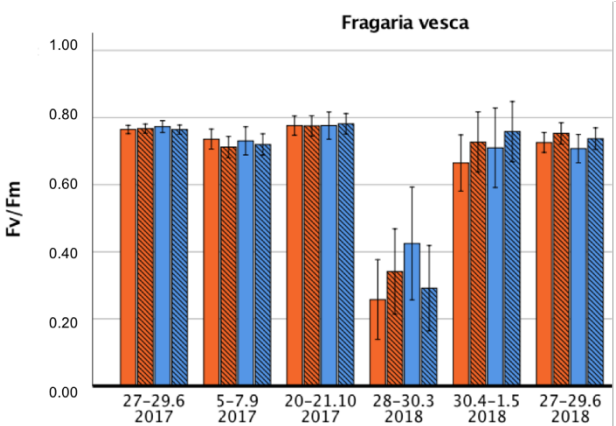
A



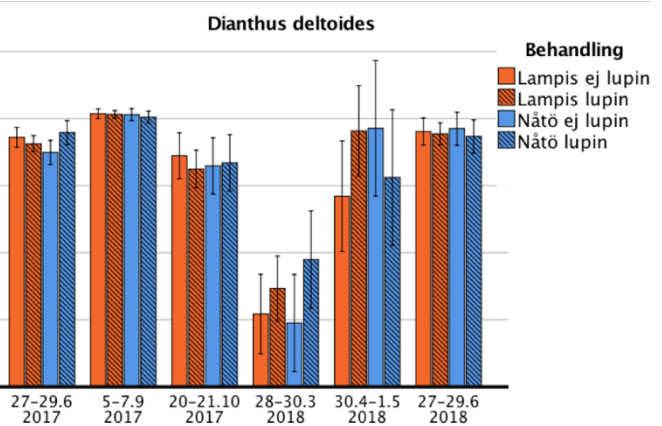
B



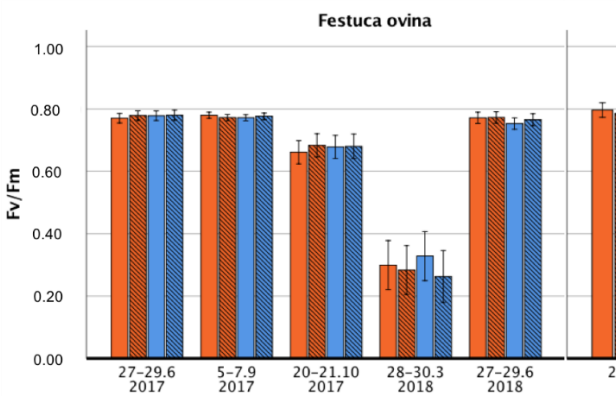
C



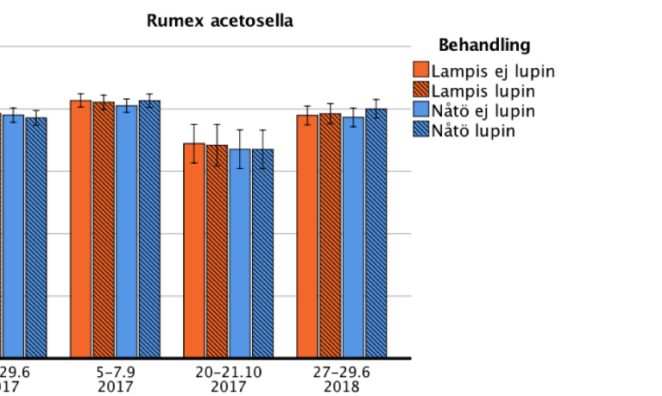
D



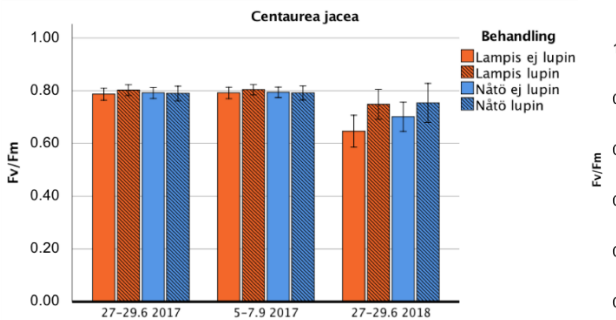
E



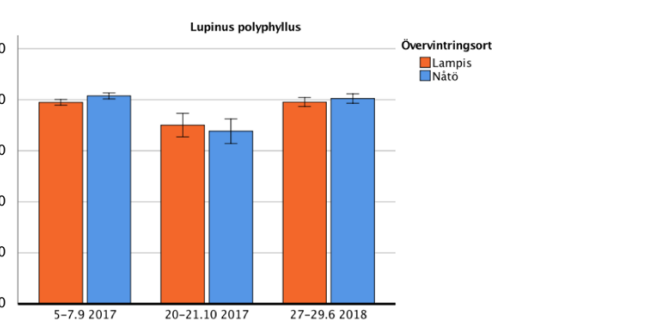
F



G



H





**Bild 8:** Uppmätta medelvärden för ängsväxternas nivåer av Fv/Fm i mesokosmerna under experimentets gång. För varje art är datan indelad i staplar enligt experimentets olika behandlingar. Orange staplar innefattar datan från mesokosmer som övervintrat i Lampis och blåa staplar innefattar datan från mesokosmer som övervintrat på Nåtö. Streckade staplar innefattar datan från mesokosmer som innehöll lupin (se teckenförklaring). För varje art anges datan från de gånger respektive art kunde mätas. Således varierar antalet mätomgångar per art. Notera datumen på x-axlarna. Felbalkar avser 95% konfidensintervall. Antal replikat per behandling för de olika arterna anges i tabell 5.

**Tabell 5:** Antal replikat per behandling som beaktats i analyserna av Fv/Fm-nivåerna för ängsarterna.

	Lampis ej lupin	Lampis lupin	Nåtö ej lupin	Nåtö lupin
<i>A. dioica</i>	9	9	9	8
<i>V. officinalis</i>	9	8	6	8
<i>F. vesca</i>	8	7	4	7
<i>D. deltoides</i>	6	9	4	4
<i>F. ovina</i>	9	9	9	8
<i>R. acetosella</i>	7	6	7	7
<i>C. jacea</i>	6	7	7	4
<i>L. polyphyllus</i>	-	9	-	8

### 3.3. Inverkan av lupin och övervintringsort på ängsarternas halter av klorofyll och flavonoider

Resultaten från mätningarna av ängsarternas pigmenthalter skiljde sig från varandra och därför rapporteras de här art för art.

#### 3.3.1. Klorofyll

Klorofyllhalterna hos *A. dioica* och *V. officinalis* uppvisade sinsemellan liknande årlig dynamik (bild 9). För båda arterna var klorofyllhalterna högre vid mätningarna i oktober än vid föregående mätningar i juli 2017 och september. Klorofyllhalterna var som lägst hos båda arterna under vårens mätningar och åter höga i början juli 2018.

Under vårens mätningar (mars och maj) var skillnaderna i klorofyllhalterna hos *A. dioica* obetydlig mellan lupinförsedda och lupinfria mesokosmer men i juli 2018 uppvisade arten i lupinförsedda mesokosmer från båda orter klorofyllhalter som var högre än de i lupinfria mesokosmer (bild 9 A). Skillnaden var närapå signifikant för mesokosmer som övervintrat i Lampis (envägs ANOVA;  $p =$

0,107). Mellan lupinförsedda och lupinfria mesokosmer som övervintrat på Nåtö var skillnaden mindre märkbar (envägs ANOVA;  $p = 0,576$ ).

Vid mätningarna i maj uppvisade *V. officinalis* högre klorofyllhalter i lupinfria mesokosmer som övervintrat på Åland jämfört med de som innehöll lupin men skillnaden var inte statistiskt signifikant (envägs ANOVA;  $p = 0,307$ )(bild 9 B). Ingen märkbar skillnad fanns mellan lupinfria och lupinförsedda mesokosmer som övervintrat i Lampis.

Vid mätningarna i juli 2018 uppvisade arten högre klorofyllhalter i lupinförsedda mesokosmer från båda orter. Skillnaden var stor i mesokosmer som övervintrat på Åland och statistiskt signifikant (envägs ANOVA;  $p = 0,001$ ), och mindre och inte signifikant för mesokosmer som övervintrat i Lampis (envägs ANOVA;  $p = 0,432$ ).

Klorofyllhalten hos *F. vesca* var lägre i september jämfört med juni 2017 vilket berodde på att bara sommarblad mättes vid denna mätomgång. Dessa höll vid denna tidpunkt på att vissna bort i samband med produktionen av vinterblad. Arten uppvisade i juli 2018 något högre klorofyllhalter i lupinfria mesokosmer från båda orter men dessa skillnader var mycket små och inte statistiskt signifikanta (envägs ANOVA;  $p = 0,941$  och  $p = 0,486$  för Lampis och Nåtö respektive)(bild 9 C). Arten uppvisade vidare något högre klorofyllhalter i mesokosmer som övervintrat på Nåtö jämfört med Lampis men denna skillnad var heller inte signifikant (envägs ANOVA;  $p = 0,289$ ).

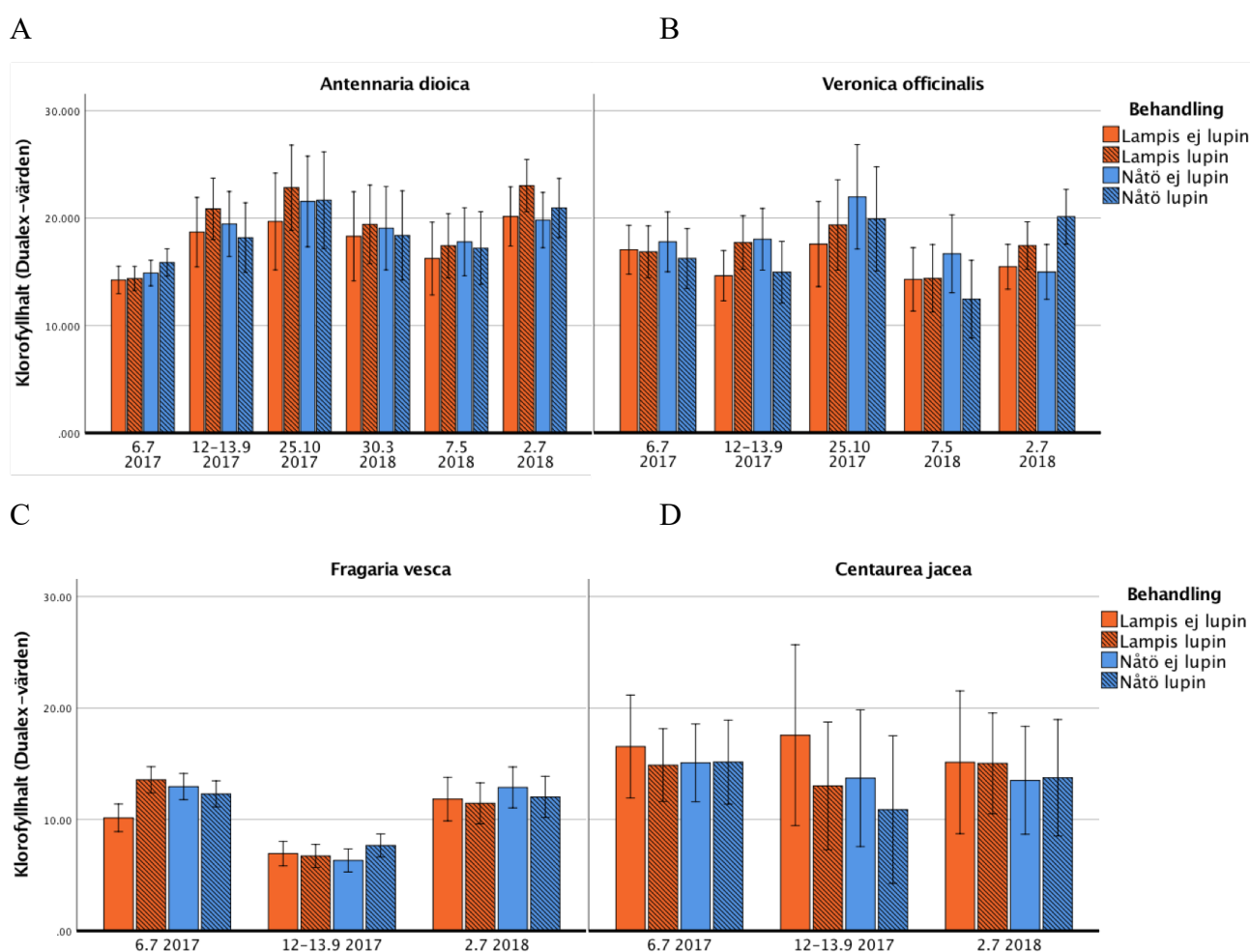
Hos *C. jacea* observerades i juli 2018 en liten skillnad i klorofyllhalter mellan mesokosmer med och utan lupin (bild 9 D). I mesokosmer som övervintrat på Åland hade *C. jacea* i medeltal något högre klorofyllhalter i juli 2018 men skillnaden var inte statistiskt signifikant (envägs ANOVA;  $p = 0,417$ ).

Klorofyllhalterna hos *R. acetosella* (uppmätt med SPAD-mätare) varierade mycket lite mellan mätomgångar (bild 9 E). Arten uppvisade i juli 2018 ingen skillnad i klorofyllhalterna mellan mesokosmer som övervintrat på olika orter (envägs ANOVA;  $p = 1,000$ ). I juli 2018 var klorofyllhalterna något högre i lupinfria mesokosmer jämfört med lupinförsedda från båda orter. Skillnaden var närapå signifikant för mesokosmer som övervintrat på Nåtö (envägs ANOVA;  $p = 0,083$ ) men mindre betydande bland mesokosmer som övervintrat i Lampis (envägs ANOVA;  $p = 0,616$ ).

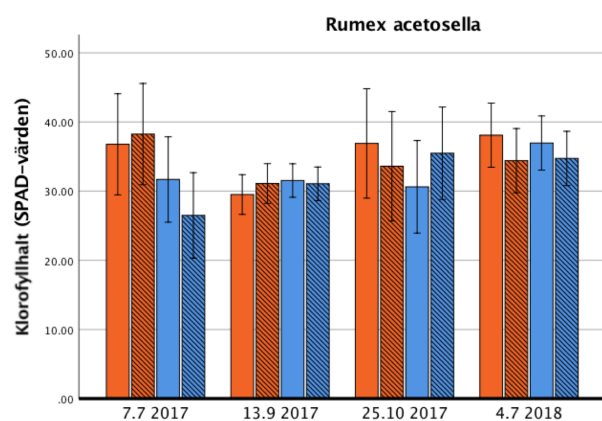
*D. deltoides* klorofyllhalt (uppmätt med SPAD-mätare) varierade överlag lite mellan mätomgångar (ANOVA för upprepade mätningar;  $p = 0,142$ ) (bild 9 F). Artens klorofyllhalter var märkbart lägre

i ålåndsmesokosmerna jämfört med mesokosmerna som övervintrat i Lampis i juli 2018 och skillnaden var nära signifikant (ANOVA;  $p = 0,056$ ). I juli 2018 hade arten märkbart lägre klorofyllhalt i lupinförsedda mesokosmer som övervintrat på Nätö jämfört med lupinfria mesokosmer och skillnaden var närapå statistiskt signifikant (envägs ANOVA;  $p = 0,133$ ). I mesokosmer som övervintrat i Lampis skiljde sig klorofyllhalten vid denna tidpunkt inte märkbart mellan lupinförsedda och lupinfria mesokosmer (envägs ANOVA;  $p = 0,714$ ).

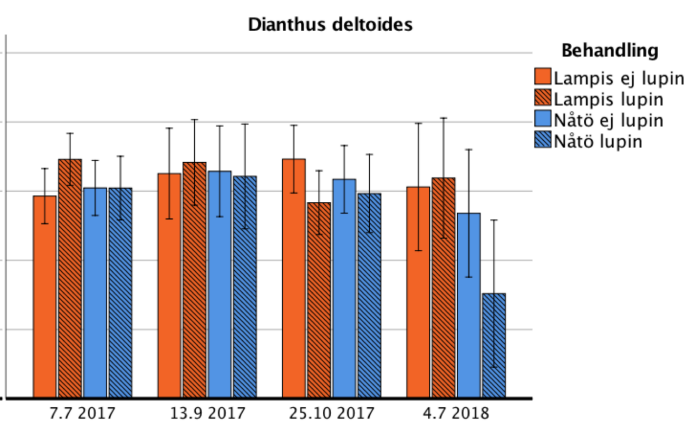
Klorofyllhalterna hos *L. polyphyllus* var signifikant högre vid mätningarna i oktober än de var i september (t-test för parade sampel; sig. = 0,001) och i juli 2018 var halterna något lägre än i oktober (bild 9 G). I juli 2018 syntes hos arten nästan ingen skillnad i klorofyllhalterna mellan mesokosmer som övervintrat på olika orter (envägs ANOVA;  $p = 0,719$ ).



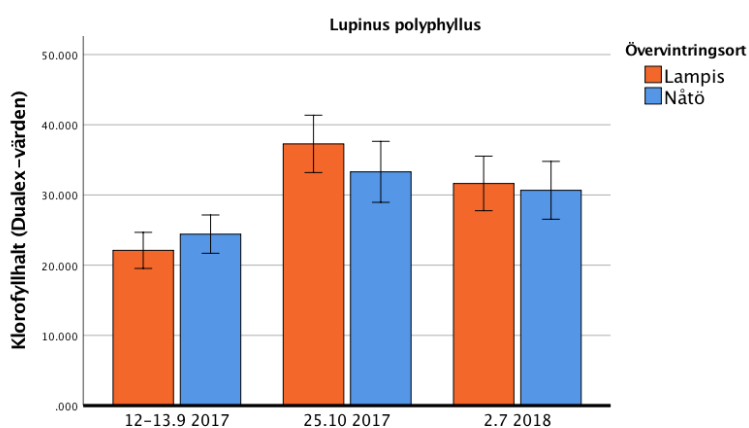
E



F



G



**Bild 9:** Medelvärden för ängsväxternas klorofyllhalter uppmätta med Dualex-mätare (samt SPAD-mätare för *R. acetosella* och *D. dianthus*) i mesokosmerna vid mätomgångarna. För varje art är datan indelad i staplar enligt experimentets olika behandlingar (närvaro/frånvaro av lupin samt övervintringsort, se teckenförklaring). För varje art visas datan från de mätomgångar då respektive art mättes. Således varierar antalet mätomgångar per art, notera datumen på x-axlarna. Felbalkar avser 95% konfidensintervall.

**Tabell 6:** Antal replikat per behandling som beaktats i analyserna av datat från Dualex-mätaren och SPAD-mätaren för ängsarterna.

	Lampis ej lupin	Lampis lupin	Nätö ej lupin	Nätö lupin
<i>A. dioica</i>	7	9	8	7
<i>V. officinalis</i>	9	8	6	6
<i>F. vesca</i>	8	9	9	9
<i>C. jacea</i>	4	8	7	6
<i>R. acetosella</i>	5	5	7	7
<i>D. deltoides</i>	8	9	8	6
<i>L. polyphyllus</i>	-	9	-	8

### 3.3.2 Flavonol

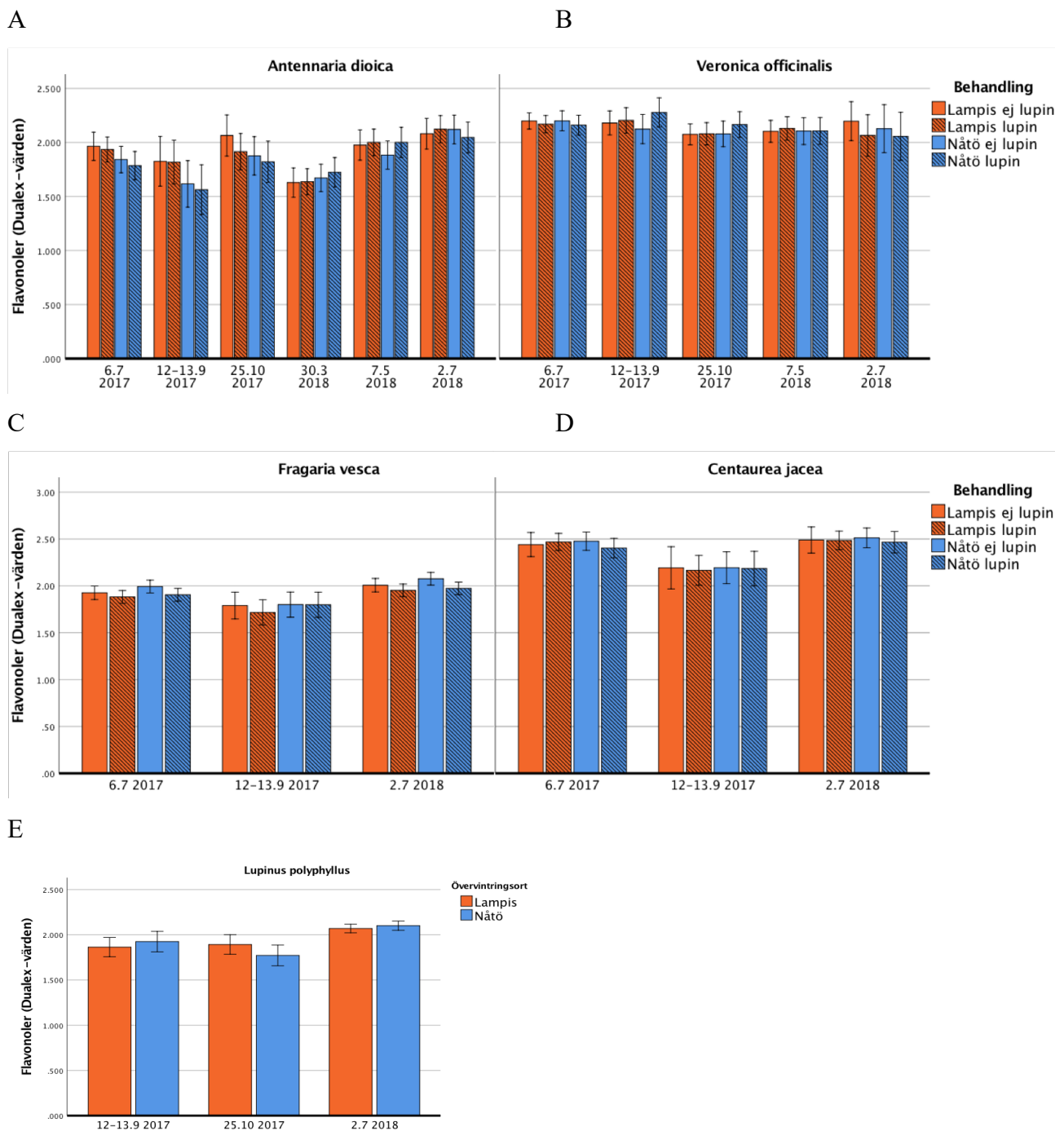
Ängsväxternas flavonolhalter varierade överlag tämligen lite mellan olika mätomgångar.

För *A. dioica* varierade flavonolhalterna signifikant under året (ANOVA för upprepade mätningar;  $p = 0,001$ ) så att de jämfört med sommarens nivå 2017 sjönk till september för att sedan åter stiga till slutet av oktober (bild 10 A). I slutet av mars var halterna som lägst och steg sedan till början av maj, och ytterligare till den högsta nivån till början av juli. Inga signifikanta skillnader mellan vare sig övervintringsort eller lupinbehandling kunde urskiljas i *A. dioicas* flavonolhalter.

Flavonolhalterna hos *V. officinalis* varierade överlag lite under året och skillnaderna mellan olika mätomgångar var sinsemellan inte statistiskt signifikanta (ANOVA för upprepade mätningar;  $p = 0,074$ ) (bild 10 B). I början av juli 2018 hade *V. officinalis* något högre medelnivå av flavonoler i lupinfria mesokosmer från båda orter jämfört med lupinförsedda mesokosmer men skillnaderna var inte statistiskt signifikanta (envägs ANOVA;  $p = 0,282$  och  $p = 0,884$  för Lampis och Nåtö respektive).

Flavonolhalterna för *F. vesca* och *C. jacea* varierade signifikant mellan mätomgångar (ANOVA för upprepade mätningar;  $p = 0,001$  samt  $p = 0,001$  för respektive art). så att den för båda arterna var lägre i september 2017 än i vare sig juli 2017 eller juli 2018. *F. vesca* hade i juli 2018 högre flavonolhalter i mesokosmer utan lupin från båda orterna (bild 10 C). Denna skillnad var signifikant för mesokosmer som övervintrat på Åland (envägs ANOVA;  $p = 0,015$ ) men inte för mesokosmer som övervintrat i Lampis (envägs ANOVA;  $p = 0,357$ ). *C. jacea* uppvisade nästan inga skillnader i flavonolhalterna mellan olika behandlingar (ANOVA för upprepade mätningar;  $p = 0,945$ ) (bild 10 D).

*L. polyphyllus* uppvisade i juli 2018 nästan ingen skillnad i flavonolhalter mellan mesokosmer som övervintrat på olika orter (envägs ANOVA;  $p = 0,648$ ) (bild 10 E). Skillnaderna mellan olika mätomgångar var små.



**Bild 10:** Medelvärden för flavonolhalter hos de ängsarter som mättes med Dualox-mätaren i mesokosmerna under experimentets gång. För varje art är datan indelad i staplar enligt experimentets olika behandlingar (närvaro/frånvaro av lupin samt övervintringsort, se teckenförklaring). För varje art visas datan från de mätomgångar som beaktats i analyserna. Notera datumen på x-axlarna. Felbalkar avser 95% konfidensintervall.

### 3.3.3. Anthocyanin

Anthocyaninhalterna för *A. dioica* och *V. officinalis* varierade signifikant under året (ANOVA för upprepade mätningar;  $p = 0,001$  och  $p = 0,001$  för respektive art). Halterna hos *A. dioica* steg till hösten (vid mätningarna i september och oktober) jämfört med halterna i juli 2017 (bild 11 A). Nivån var lägst vid mätningarna i mars och steg till maj.

Vid mätomgångarna i mars och i maj hade *A. dioica* i medeltal högre halter av anthocyanin i de mesokosmer som övervintrade på Åland jämfört med Lampis men skillnaderna var inte statistiskt signifikanta (ANOVA för upprepade mätningar;  $p = 0,933$ ). Vid mätningarna i maj hade arten överlag högre halter av anthocyanin i lupinförsedda mesokosmer. Denna skillnad var statistiskt signifikant mellan mesokosmer som övervintrat på Åland (ANOVA;  $p = 0,034$ ). I juli 2018 hade arten överlag högre anthocyaninhalter i lupinfria mesokosmer jämfört med lupinförsedda och skillnaden var nära signifikant (ANOVA;  $p = 0,070$ ). Halterna var i medeltal högre i lupinfria mesokosmer från båda orterna men skillnaderna var inte statistiskt signifikanta då orterna analyserades enskilt (envägs ANOVA;  $p = 0,292$  och  $p = 0,140$  för Lampis och Nåtö respektive).

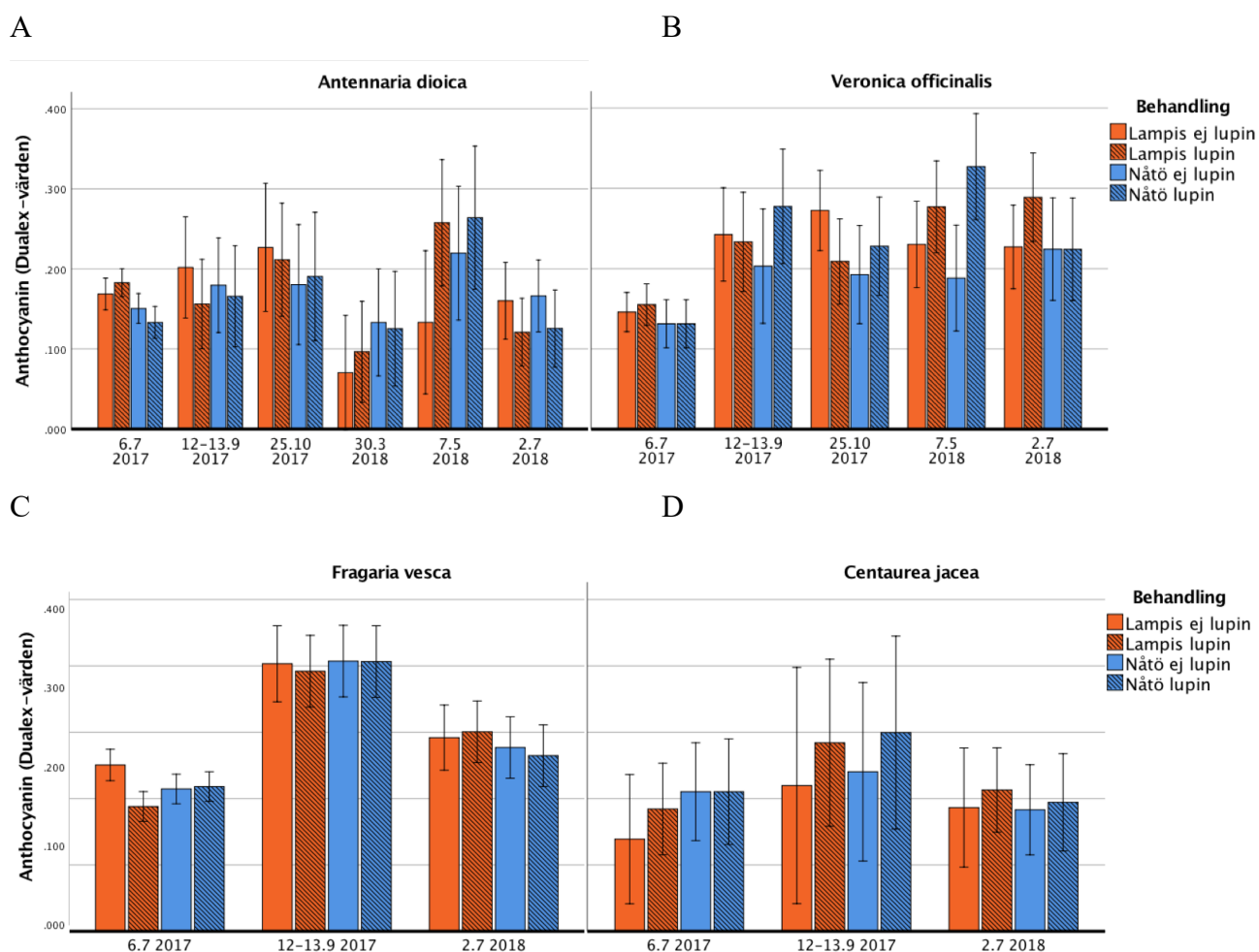
*V. officinalis* uppvisade sina lägsta halter av anthocyanin vid mätningarna i juli 2017 (bild 11 B). Nivån var signifikant högre vid mätningarna i september (t-test för parade sampel; sig. = 0,001) och låg i fortsättningen på ungefär samma nivå vid alla följande mätomgångar (oktober 2017 samt maj och juli 2018). Vid mätningarna i maj var *V. officinalis* anthocyaninhalter överlag högre i lupinförsedda mesokosmer jämfört med lupinfria (ANOVA;  $p = 0,006$ ). Skillnaden var statistiskt signifikant för mesokosmer som övervintrade på Åland (ANOVA;  $p = 0,002$ ) men inte för de som övervintrade i Lampis (envägs ANOVA;  $p = 0,290$ ). I juli 2018 uppvisade arten högre medelnivåer av anthocyanin i lupinförsedda mesokosmer som övervintrat i Lampis jämfört med lupinfria mesokosmer från samma ort. Skillnaden var närapå statistiskt signifikant (envägs ANOVA;  $p = 0,087$ ). Denna skillnad återfanns inte i mesokosmer som övervintrat på Åland för vilka artens anthocyaninhalter var de samma för lupinförsedda och lupinfria mesokosmer (envägs ANOVA;  $p = 0,439$ ). Både *A. dioica* och *V. officinalis* uppvisade stor variation i uppmätta värden av anthocyanin för enskilda behandlingar, särskilt vid mätningarna under våren.

*F. vesca* och *C. jacea* uppvisade båda en ökning i anthocyanin vid mätningarna i september jämfört med sommarmätningarna i juli 2017 och 2018. Sommarbladen hos *F. vesca* uppvisade i juli 2018

något högre halter av anthocyanin i mesokosmer som övervintrat på Lampis jämfört med Nåtö men skillnaden var inte statistiskt signifikant (envägs ANOVA;  $p = 0,204$ ) (bild 11 C)

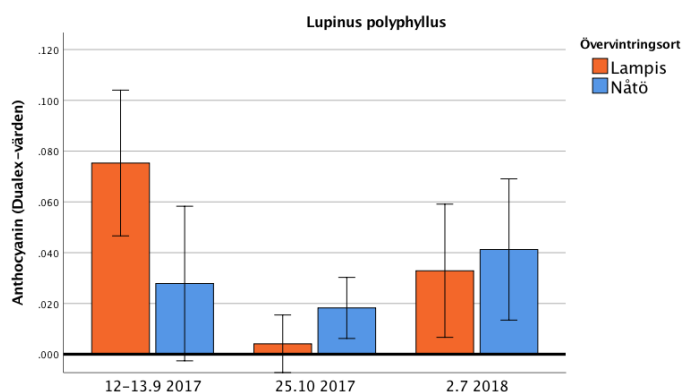
*C. jacea* uppvisade något högre halter av anthocyaniner i lupinförsedda mesokosmer oberoende av övervintringsort. Dessa skillnader var dock små och inte statistiskt signifikanta (envägs ANOVA;  $p = 0,841$  och  $p = 0,818$  för Lampis och Nåtö respektive) (bild 11 D).

*L. polyphyllus* hade i juli 2018 något högre medelnivåer av anthocyaniner i mesokosmer som övervintrat på Åland jämfört med Lampis men skillnaden var liten och variationen inom samplen mycket stor (envägs ANOVA;  $p = 0,648$ ) (bild 11 E). Till skillnad från ängsarterna hade *L. polyphyllus* mycket låga halter av anthocyaniner på hösten.





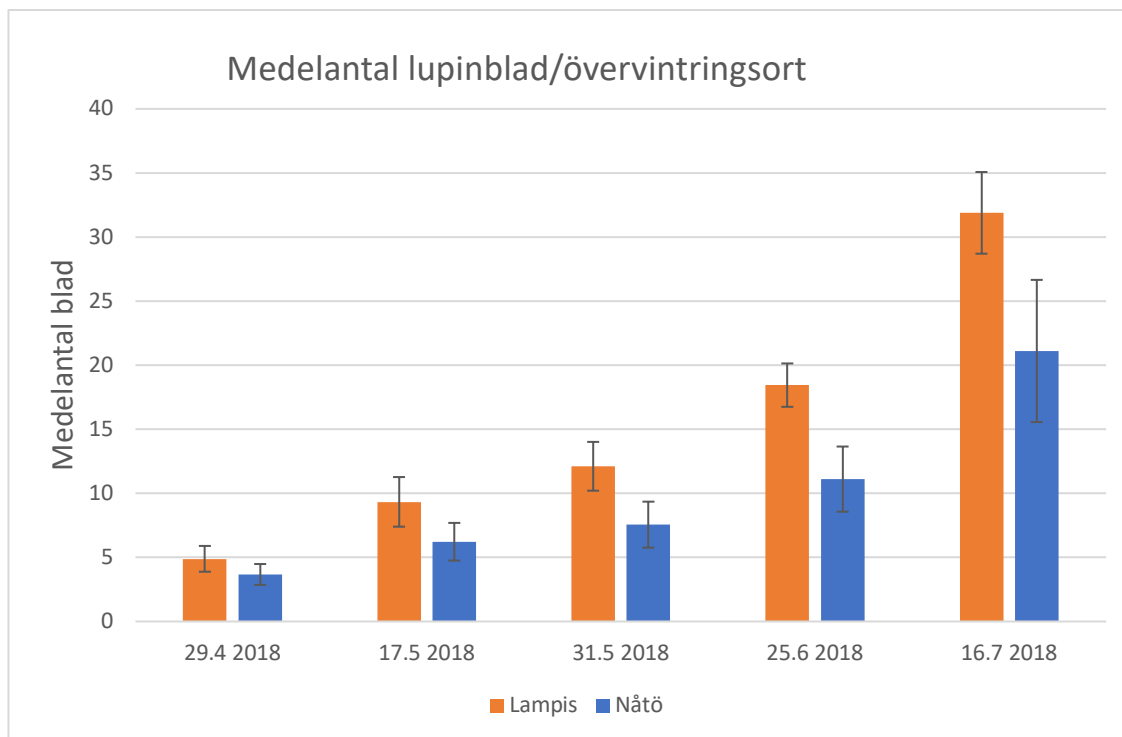
E



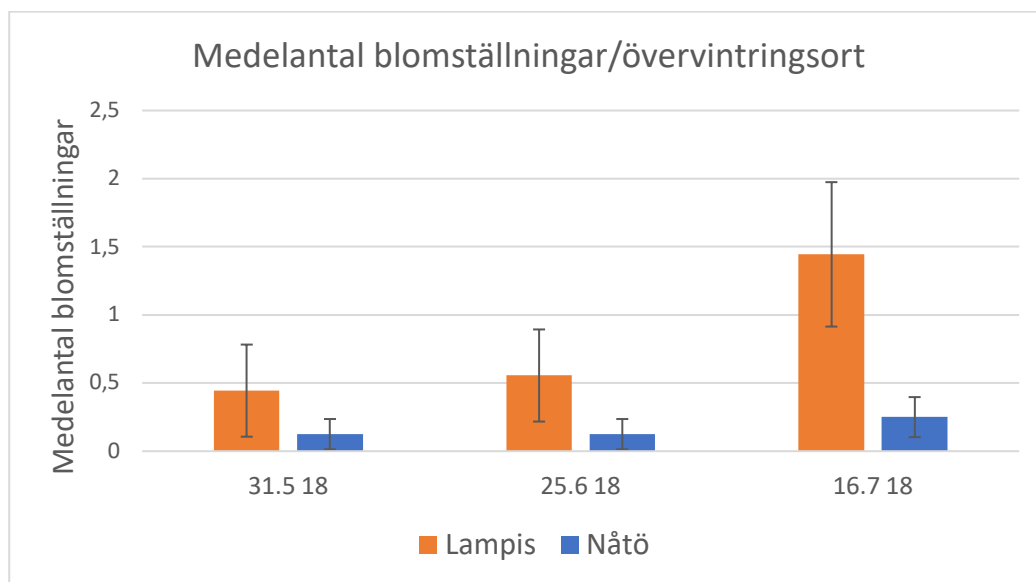
**Bild 11:** Medelvärden för anthocyaninhalterna hos de ängsarter som mättes med Dualox-mätaren i mesokosmerna under experimentets gång. Notera skillnader i y-axlarna. För varje art är datan indelad i staplar enligt experimentets olika behandlingar (närvaro/frånvaro av lupin samt övervintringsort, se teckenförklaring). För varje art visas datan från de mätomgångar som beaktats i de statistiska analyserna. Notera datumen på x-axlarna. Felbalkar avser 95% konfidensintervall.

### 3.4. Lupinernas tillväxt och blomning

Lupinerna som övervintrade i Lampis uppvisade kraftigare tillväxt under tillväxtsåsonen 2018 än de lupiner som övervintrade på Åland, både vad beträffar antalen producerade blad och blomställningar. Den 16 juli 2018 hade lupinerna från Lampis i medeltal ca. 10 blad fler än lupinerna från Nätö (bild 12). Vidare bör noteras att lupinerna från Lampis uppvisade snabbare tillväxt redan tidigt på våren och att skillnaden växte då tillväxtsåsonen framskred. Skillnaden var signifikant (ANOVA för upprepade mätningar;  $p = 0,046$ ). I lupinförsedda mesokosmer som övervintrat i Lampis producerade lupinerna sammanlagt 13 blomställningar i 5 olika mesokosmer under sommaren 2018 (bild 13). I lupinförsedda mesokosmer som övervintrat på Åland producerade lupinerna sammanlagt endast 2 blomställningar i 2 olika mesokosmer under samma tidsperiod. Skillnaden var närapå statistiskt signifikant (ANOVA för upprepade mätningar;  $p = 0,073$ ).



**Bild 12:** Medelantalet blad hos lupinerna i mesokosmer som övervintrade i Lampis respektive Nåtö under vintern 2017-18. Antalet blad räknades vid fem tillfällen under våren och sommaren 2018. Notera datum på x-axlarna. Felbalkar avser standardfel. Lampis  $n = 8$ , Nåtö  $n = 9$ .



**Bild 13:** Sammanlagt antal blomställningar som lupinerna som övervintrade i Lampis respektive Nåtö producerade under våren och sommaren 2018. Skillnaden var närapå statistiskt signifikant (ANOVA för upprepade mätningar;  $p = 0,073$ ). Lampis  $n = 8$ , Nåtö  $n = 9$ .

## 4. Diskussion

### 4.1. Ängsarternas Fv/Fm

Överlag uppvisade alla ängsarter sinsemellan liknande mönster i den årliga dynamiken i Fv/Fm. Nivåerna av Fv/Fm var höga under sommaren och långt in på hösten och sjönk betydligt under vintern. Vinterns låga nivåer avspeglades av de låga men mätbara nivåerna som uppmättes i slutet av mars även om inga mätningar gjordes under själva övervintringsperioden. I början av maj var nivåerna åter höga och i slutet av juni 2018 uppvisade alla arter Fv/Fm-nivåer som låg nära den maximala teoretiska nivån ( $Fv/Fm = \sim 0,83$ ) (Baker, 2008). Alla ängsarter hade i september lika höga eller högre nivåer av Fv/Fm jämfört med slutet av juni 2017. Detta är inte överraskande i och med att arterna som användes i studien har nordliga utbredningsområden och därmed är adapterade för effektiv fotosyntes vid svalare temperaturer ( $\sim 15^\circ\text{C}$ ) än de som typiskt råder under högsommaren ( $\sim 20\text{--}30^\circ\text{C}$ ) (Berry & Björkman, 1980; Braun & Neuner, 2005). Växter som är anpassade till svala klimat uppvisar i stort sett en sinsemellan liknande fotosyntetisk respons på temperatur, med ett tämligen brett spektrum ( $\sim 10\text{--}20^\circ\text{C}$ ) som är fördelaktigt för fotosyntesen (Berry & Björkman, 1980). Inom detta spektrum har arter olika optimitemperaturer för fotosyntes, vilket förmodligen förklarar de olika nivåerna av Fv/Fm som ängsarterna uppvisade i september och oktober.

I oktober hade alla ängsarter med undantag för smultronet tydligt lägre nivåer av Fv/Fm än i september. Detta berodde troligtvis på att temperaturen den veckan låg kring  $5^\circ\text{C}$  (data från väderstationen på Viks campus) vilket är lägre än ängsarternas relativt låga fotosyntetiska temperaturfordringar. Dessutom uppmättes årets första minusgrader natten innan fluorescensmätningarna gjordes, vilket eventuellt kan ha påverkat växternas fotosyntetiska kapacitet omedelbart. Smultronet uppvisade i sin tur höga nivåer av Fv/Fm vilket stämmer överens med en tidigare studie av Åström m.fl. (2012) som visade att smultronet upprätthåller förhållandevis hög fotosyntetisk kapacitet långt in i november. Den höga nivån möjliggjordes av att smultronet i detta skede hade färdigt utvecklade vinterblad som är anpassade till att utföra fotosyntes så fort temperaturen överstiger noll grader (Åström m. fl., 2012).

Med tanke på hur mycket vinterförhållandena skiljde sig mellan Lampis och Nätö är det intressant att de olika övervintringsförhållandena inte syntes som märkbara skillnader i Fv/Fm mellan ängsväxter som övervintrat på olika orter. Det stämmer delvis överens med resultat som erhöles av

Solanki m. fl. (2019) som påvisade att Fv/Fm hos bladen på lingonplantor var olika beroende på snötäckets tjocklek, så att de lingonplantor som övervintrat under djupare snö hade högre Fv/Fm än de som varit täckta av ett tunnare snötäcke. Skillnaderna gällde under våren vid snösmältningen, men till sommaren hade alla lingon åter uppnått sinsemellan liknande max-värden vilket även var fallet i mesokosmstudien. Eftersom snötäcket var tjockt och bestående i Lampis och relativt tunt och kortvarigt på Nåtö skulle dylika skillnader som Solanki m. fl. (2019) observerade vara förväntade mellan övervintringsorterna under vårens mätningar. Eventuellt kunde dynamiken samt artspecifika skillnader i återhämtningen hos ängsväxternas Fv/Fm ha iakttagits ifall flera mätningar gjorts under snösmältningsperioden i mars-april skiftet 2018.

Resultaten tyder på att nordliga vintergröna växter har ett brett toleransområde beträffande snödjup och temperatur under vintern och god motståndskraft mot fluktuerande vintertemperaturer såsom upplevdes på Nåtö. I en studie av subarktisk hedvegetation observerade Bokhorst m. fl. (2009) dock omfattande köldskador på populationer av kråkbär (*Empetrum nigrum*) till följd av en varm period mitt i vintern då lufttemperaturen kortvarigt fluktuerade med liknande magnitud som på Nåtö under våren 2018. Händelsen resulterade i en stor andel döda skott samt betydligt minskad blomning hos kråkbäret under följande tillväxtsäsong.

Det här väcker frågan om vilken roll som spelas av den varierande årliga köldacklimatiseringen hos vintergröna växter. Eventuellt uppnådde ängsarterna på Nåtö en högre grad av köldacklimatisering under vintern 2017-18 jämfört med de som övervintrade i Lampis, eftersom där inte bildades ett snötäcke som reglerade temperaturen. Förmodligen har vintergröna växter i maritima klimat större behov av fysiologisk köldacklimatisering än växter i inlandet vilket antyds av de omärkliga skillnaderna i ängsarternas Fv/Fm beroende på övervintringsort.

#### **4.2. Effekten av övervintringsförhållanden på klorofyllhalter hos ängsväxterna**

Överlag skiljde sig ängsarternas klorofyllhalter inte mellan mesokosmer som övervintrat på olika orter. Undantaget till detta var backnejlikan som i juli 2018 hade märkbart lägre klorofyllhalter i mesokosmer som övervintrat på Nåtö. Denna skillnad avspeglades inte i backnejlikans Fv/Fm för olika övervintringsorter. Backnejlikan har en sydligt betonad utbredning i Finland och naturligt förekommer den rikligt på Åland (Kasviatlas, 2018). Därför är det intressant att arten uppvisade en negativ respons på vinterförhållandena där. Möjligen har åländska populationer av backnejlikan lokala anpassningar som underlättar artens övervintring där.

### 4.3. Lupinens inverkan på klorofyllhalterna och Fv/Fm hos ängsväxterna

I rödklintens Fv/Fm-nivåer syntes i juli 2018 en liten, men signifikant positiv respons på lupinbehandlingen. Resultatet bör dock tolkas med försiktighet i och med att Fv/Fm hos rödklinten inte mättes under våren. Därmed jämfördes sommarens nivåer 2018 enbart med de relativt stabila nivåer som uppmättes sommaren 2017, medan vårens nivåer som för andra arter varierade mycket mellan olika mesokosmer, inte beaktades i variansanalysen av rödklinten. Även smultronet hade något högre nivåer av Fv/Fm i lupinförsedda mesokosmer både i april och i juli 2018. Skillnaderna var visserligen små och inte statistiskt signifikanta, men eventuellt kan arten i likhet med rödklinten ha dragit en liten nytta av lupinens närvaro vad beträffar dess fotosyntetiska kapacitet. Ingendera art uppvisade dock högre klorofyllhalter i lupinförsedda mesokosmer, vilket väcker tvivel om huruvida ökad kvävetillgång låg bakom de högre Fv/Fm-nivåerna. Ifall dessa eller andra ängsarter drog nytta av kvävetillskottet från lupinen borde detta i första hand ha tagit sig uttryck som en högre klorofyllhalt (Peng m. fl., 1996; Mauromicale m. fl., 2006) och i andra hand som högre Fv/Fm. Alltså, då ängsarter hade högre Fv/Fm i lupinmesokosmer, men detta inte sammanföll med högre klorofyllhalter jämfört med lupinfria mesokosmer berodde ökningen i Fv/Fm förmodligen inte på ett tillskott av kväve. Även bergsyran uppvisade en liknande respons på lupinens närvaro som smultronet och rödklinten och hade högre klorofyllhalter i lupinförsedda mesokosmer jämfört med lupinfria. Hos denna var också Fv/Fm lite högre i lupinförsedda mesokosmer, men skillnaden var nästan omärklig.

Vad beträffar dessa arter är det tänkbart att lupinens skuggande inverkan kan ha varit orsaken till de något högre Fv/Fm-nivåerna som observerades i lupinförsedda mesokosmer under sommaren 2018 då lupinerna hade vuxit sig stora. Under lupinernas första sommar 2017 var de relativt små och deras effekt på kvävebalansen och ljusmiljön i mesokosmerna var förmodligen liten före tillväxtsäsongen 2018.

Skuggning innebär lägre ljusmängder, vilket borde leda till en lägre grad av fotoinhibition och således relativt sett högre PSII-aktivitet (och Fv/Fm) jämfört med växterna i lupinfria mesokosmer som växte i fullt solljus under sommaren. Detta skulle stämma överens med en studie av Mauro m.fl. (2011) där högre Fv/Fm observerades hos två klöverarter (*Trifolium subterraneum* och *T. brachycalycinum*) som respons på skuggning. I studien observerades vidare en liten minskning i de skuggade klöverplantornas klorofyllhalter, vilket delvis också var fallet i mesokosmstudien där smultronet och bergsyran hade lite lägre klorofyllhalter i lupinförsedda mesokosmer, medan rödklintens klorofyllhalter var de samma i mesokosmer med och utan lupin.

Flera studier har dock visat att klorofyllhalter hos icke-kvävefixerande arter stiger i respons på skuggning. Detta förmodas bero på att växter under minskad ljusintensitet söker utnyttja det tillgängliga ljuset till fullo genom att reglera upp halterna av fotosyntetiska pigment (Dai m. fl., 2009; Huang m. fl., 2016; Rezai m. fl., 2017).

I sin studie föreslog Mauro m.fl. (2011) att minskningen i klöverarternas klorofyllhalter som respons på skuggning skulle bero på att dessa är kvävefixerande arter. Enligt forskarnas arbetshypotes skulle mindre ljusmängder eventuellt leda till nedreglering av den energikrävande kvävefixeringen i rötterna, vilket i sin tur skulle ta sig uttryck i sänkta klorofyllhalter i bladen för att spara kväve. Eftersom ingen av de ovannämnda arterna i mesokosmstudien är kvävefixerare skulle det i linje med andra studier vara förväntat att klorofyllhalter hos dessa vore högre under skuggan av lupinen. Ur denna synvinkel är det då möjligt att de lägre klorofyllhalter som observerades hos smultron och rödklint i skuggan av lupinen är ett stressymptom på lupinens närvaro vilket i så fall högst troligt skulle överväga den lilla nytta som en marginell ökning i Fv/Fm medför. Detta kunde då vidare utgöra ett tidigt fysiologiskt symptom på att dessa ängsarter håller på att bli utkonkurrerade av lupinen.

Olika växtarter tolererar skuggning olika bra och dessutom har arterna olika potential för plastiska anpassningar till skugga (Corré, 1983). Skillnaderna i ängsarternas klorofyllhalter i respons på lupinens närvaro kan därmed delvis bero på artspecifik skuggtolerans hos ängsarterna. Plastiska anpassningar till skugga innebär visserligen ofta förändringar i morfologiska och anatomiska karakteristika särskilt i bladen (Corré, 1983). Den här typen av förändringar uppföljdes dock inte i mesokosmstudien.

Kattfot och ärenpris uppvisade en sinsemellan liknande respons beträffande klorofyllhalter. Den årliga dynamiken i klorofyllhalter hos dessa arter följde nära dynamiken hos deras nivåer av Fv/Fm, med undantag från de mätningar som gjordes i oktober då Fv/Fm hade sjunkit märkbart jämfört med tidigare mätomgångar medan klorofyllhalter hos båda arterna stigit. Detta berodde antagligen på att mätningarna gjordes kort efter att temperaturen sjunkit. Årets första frost inträdde natten innan mätningarna. En sänkning i Fv/Fm antyder att fotoinhibition begränsar bladets operationella fotosyntes och under kalla temperaturer kan detta ske redan vid de lägre ljusnivåerna i oktober (Feild m. fl., 2009; Lawson m. fl., 2012). Förmodligen avspeglade sänkningen i Fv/Fm således en kortsiktig respons hos fotosyntesapparaten på kalla temperaturer, medan responsen hos bladens klorofyllhalter troligtvis framkom med längre fördröjning. Detta stämmer överens med en studie av Kalisz m. fl. (2016) där Fv/Fm hos basilika (*Ocimum basilicum*) sjönk i respons på åtta dagar vid + 6°C medan klorofyllhalter inte gjorde det. Arternas höga klorofyllhalter vid denna

tidpunkt berodde i sin tur antagligen på att förhållandena för fotosyntes varit kontinuerligt gynnsamma under höstens tidigare milda temperaturer, innan kylan anlände.

En intressant skillnad syntes i klorofyllhalterna hos kattfot och ärenpris som respons på lupinens närvaro. Till skillnad från de andra ängsarterna hade både kattfot och ärenpris i juli 2018 märkbart högre klorofyllhalter i lupinförsedda mesokosmer jämfört med lupinfria och skillnaden gällde både i mesokosmer som övervintrat i Lampis och på Nåtö. För ärenpris var skillnaden statistiskt signifikant mellan lupinförsedda och lupinfria mesokosmer från Nåtö. Vid samma tidpunkt uppvisade arterna inga dylika skillnader i Fv/Fm-nivåerna, vilket antyder att skillnaderna i klorofyllhalterna inte berodde på skillnader i ljusmiljön såsom eventuellt var fallet för de andra ängsarterna. Resultaten kan därför tyda på att kattfot och ärenpris drog nytta av lupinens närvaro via det kvävetillskott som lupinen tillförde mesokosmerna, vilket vidare tog sig uttryck i högre klorofyllhalter i bladen hos dessa arter.

Kattfot och ärenpris skiljer sig från de andra ängsarterna genom att de i huvudsak bibehåller sina gröna ovanjordiska delar genom hela vintern och såtillvida funktionellt sett påminner om städsegröna ris. Många av de andra ängsarterna bibehöll visserligen ett fåtal blad genom vintern, men merparten av de ovanjordiska delarna vissnade. Enligt Bilbrough m. fl. (2000) är det möjligt för växter att ta upp kväve från marken under sen vinter och tidig vår. Larsen m. fl. (2012) undersökte kväveupptag hos olika övervintrande subarktiska växter med hjälp av  $N^{15}$ -isotoper och fann att just städsegröna ris effektivt upptar kväve ur jordmånen under tidig vår jämfört med andra funktionella grupper. Detta förmodades bero på att dessa vid denna tid hade en relativt hög fotosyntetisk kapacitet tack vare sina gröna blad. Hypotetiskt sett kunde kattfot och ärenpris i egenskap av vintergröna växter ha utnyttjat denna strategi och därmed eventuellt kapitalisera på de kvävetillskott som lupinen tillförde mesokosmerna under tidig vår, innan de andra ängsarterna var aktiva. I samma studie observerade Larsen m.fl. (2012) dock att de städsegröna risen redan i april och maj allokerade det upptagna kvävet till sina ovanjordiska delar, medan kattfot och ärenpris i mesokosmstudien uppvisade högre klorofyllhalter i lupinförsedda mesokosmer först i början av juli 2018. Denna skillnad väcker tvivel om huruvida kväveupptag under den tidiga våren var av betydelse för klorofyllhalterna hos dessa arter under sommaren. Alternativt är det tänkbart att kattfot och ärenpris konkurrerar effektivt om kväve jämfört med de andra ängsarterna. Även i detta fall kunde dessa ha gynnats ytterligare av att vara fotosyntetiskt aktiva redan tidigt under våren, eftersom de därmed lyckas starta sin tillväxt både ovan och under jord så fort omgivningsförhållanden tillät det och förekomma de andra ängsarterna.

Miller m.fl. (2007) påvisade att arter skiljer sig i sin förmåga att konkurrera om kväve i jordmånen och vidare att upptagningsförmågan hos en viss art påverkas av vilka grannarter den växer med. Det är möjligt att kattfot och ärenpris var effektiva konkurrenter i just det modellsystem som mesokosmerna utgjorde. Även backnejlika bibehöll tämligen mycket ovanjordiska gröna delar genom vintern, men responsen hos artens klorofyllhalter var annorlunda än den hos kattfot och ärenpris. En tänkbar delorsak till skillnaderna i kväveupptagningsförmågan hos de städsegröna växterna i mesokosmstudien kan vara att arter har olika preferenser för olika former av kväve (Miller m. fl., 2007). Ifall kvävefixeringen i lupinens rotnölar resulterade i att jordmånen i de lupinförsedda mesokosmerna berikades mer med en viss form av kväve – exempelvis ammoniumkväve snarare än nitratkväve – kan kvävetillskottet ha gynnat de arter som föredrar denna form, mera än arter som föredrar andra former av kväve.

Svagheter med fluorescensanalysen i studien var att mätningar för vissa arters del utfördes på blad av olika ålder vilket kan påverka värdet för Fv/Fm (Logan m. fl., 2007; Solanki m. fl., 2019). Därtill mättes i olika mesokosmer blad som i vissa fall utvecklats under olika ljusförhållanden på en mikroklimatisk skala. Dessa faktorer kan ha infört variation i mätresultaten som gjorde eventuella effekter av de olika behandlingarna mindre tydliga (Logan m.fl., 2007). Vidare fungerar Fv/Fm som en allmän indikator på sådana typer av stress som påverkar fotosyntesen direkt, men inte på andra former av stress som kan påverka tillväxten, exempelvis kylskador på rötterna (Murchie & Lawson, 2013). Studien fokuserade inte på ängsarternas tillväxt, utan enbart på optiska fysiologiska parametrar. Det är således möjligt att den stress som Nåtös fluktuerande vinterförhållanden medförde påverkade ängsarternas tillväxt negativt, men att den inte tog sig uttryck i Fv/Fm-parametern. Under sommaren 2018 observerades att blad vid god hälsa även hos nödvuxna växtindivider hade höga nivåer av Fv/Fm.

#### **4.4. Effekten av övervintringsförhållanden och lupinen på ängsväxternas flavonoidkoncentrationer**

Vid olika årstider kunde en antydning om sinsemellan kontrasterande responser i halterna av flavonol och anthocyanin urskiljas hos ängsväxterna. Responserna var inte helt konsekventa hos alla arter, men generellt sett var ängsväxternas flavonolhalter höga under sommaren 2017 och 2018, och lägre under hösten. Halterna av anthocyanin tenderade i sin tur vara höga under hösten och våren, och jämförelsevis låga under sommaren 2017 och 2018. Detta kan vara en följd av att dessa olika grupper av flavonoider delvis har olika funktioner relaterade till fotoprotektion (Klem m. fl. 2015). Eftersom flavonoler effektivt absorberar ultraviolett ljus är det möjligt att dessa, jämfört med



anthocyaniner, har en mer utpräglad roll inom absorption och värmedissipering av kraftig ljusstrålning vilket är nödvändigt särskilt under sommarens höga ljusintensiteter. Anthocyaniner absorberar våglängder inom den fotosyntetiskt aktiva strålningens område; PAR (eng. *photosynthetically active radiation*) och minskar ljusstress som uppkommer av denna typ av strålning (Klem m. fl., 2015). Därutöver uppfyller anthocyaniner en viktig roll som effektiva antioxidanter, vilket anses vara av stor betydelse särskilt vid kalla temperaturer då fotosyntesapparatusens ljusupptagningsförmåga är begränsad (Chalker-Scott, 1999; Agati m. fl., 2012).

Hos smultron, rödklint och lupin var flavonolhalterna som högst under sommarmätningarna och lägre i september. Samma mönster kunde delvis urskiljas hos kattfot, men hos denna syntes en ökning av flavonolhalterna i oktober, vilket tyder på att kalla temperaturer påverkade även flavonolhalterna hos denna. Överlag skiljde sig ängsväxternas flavonolhalter relativt lite mellan olika behandlingar. I juli 2018 hade ärenpris och smultron något högre flavonolhalter i lupinfria mesokosmer, vilket förmodligen berodde på att dessa var utsatta för kraftigare ljusnivåer i frånvaro av den skuggande lupinen. Skillnaderna var ganska små och hos de andra ängsarterna syntes ingen märkbar skillnad i flavonolhalter mellan olika behandlingar. En tänkbar förklaring till varför bara små skillnader observerades kan vara att ljusomgivningen inne i ett lövverk tenderar att vara relativt berikad med ultraviolettera våglängder jämfört med PAR (i detta fall avses med termen lövverk mesokosmernas lågväxta vegetationsskikt trots att termen vanligtvis används för skog). Orsaken till detta är delvis att växters blad absorberar PAR effektivt men inte UV, och delvis att den diffusa spridningen av ultraviolettera våglängder är kraftigare än för synligt ljus (Robson m. fl., 2015). Det här leder till att blad i skugga har tillgång till betydligt mindre PAR medan den ultraviolettera (och potentiellt skadliga) proportionen av strålningen minskar mindre.

Det är känt att anthocyaniner ackumuleras i bladen under hösten hos sådana arter som genetiskt uttrycker dem och att denna egenskap är vanlig bland vintergröna växter (Hughes & Smith, 2007). Orsaken till detta förmodas vara en foto-protektiv respons på kalla temperaturer, vid vilka redan moderata ljusnivåer saturerar fotosyntesen och kan orsaka fotoinhibition (Feild m. fl., 2009). Ackumulering av anthocyanin anses också vara ett kännetecken för gamla blad som är i slutet av sin livscykel (Martz m. fl., 2010), vilket förmodligen förklarar varför smultronet hade höga halter av anthocyanin i mitten av september då sommarbladen påbörjade sin senescens.

Bortsett från ärenpris uppvisade alla ängsarter högre koncentrationer av anthocyanin under höst- och vårmätningarna 2017 än under sommarmätningarna i början av juli både 2017 och 2018.

Det tyder på att ackumuleringen av anthocyanin i bladen inducerades av kalla temperaturer, snarare än som direkt respons på hög ljusintensitet. Eventuellt kan även den förändrade fotoperioden under hösten även ha påverkat anthocyaninhalterna, men det har observerats att kortare dagar vanligen leder till mindre anthocyanin hos växter eftersom den totala ljusmängden minskar (Jaakkola & Hohtola, 2010). Hos kattfoten uppmättes visserligen lägre koncentrationer av anthocyanin i slutet av mars, dagen efter att snötäcket smultit bort från mesokosmerna som hämtats från Lampis (snötäcket på Nåtö hade smultit redan tidigare). Koncentrationerna var då något högre i de mesokosmer som övervintrat på Nåtö, vilket troligen berodde på att växterna redan en tid hade varit exponerade för starkt ljus. Växterna från Lampis hade tack vare snötäckets skydd undvikit liknande ljusstress. Kattfot var den enda art som kunde mätas vid denna tidpunkt så resultatet kan inte jämföras med andra arter i mesokosmstudien. De uppmätta koncentrationerna av anthocyanin i mars var dock av liknande storlek som Solanki m. fl. (2019) observerade då lingonblad mättes genast efter snösmältningen med samma Dualex-apparat som användes i mesokosmstudien. Solanki m. fl. (2019) observerade vidare att lingonbladens anthocyaniner steg under perioden efter snösmältningen vilket även var fallet i mesokosmstudien för kattfot och ärenpris (andra arter kunde inte ännu mätas i maj). Resultaten indikerar att just kombinationen av ljus och kalla temperaturer fungerar som signal för produktionen av anthocyanin i bladen hos somliga vintergröna växter. Detta har även antytts av tidigare studier (Martz m. fl., 2010; Solanki m. fl., 2019)

Ett något överraskande resultat var att kattfot och ärenpris i maj hade märkbart högre koncentrationer av anthocyanin i lupinförsedda mesokosmer jämfört med lupinfria. Studier har visat att växters flavonoidkoncentrationer tenderar att öka under kvävefattiga förhållanden (Stewart m. fl., 2001; Cartelat m. fl., 2005). Således vore det förväntat att arterna skulle ha högre koncentrationer av anthocyanin i mesokosmer utan lupin.

Power m.fl. (1998) observerade tidigarelagd tillväxt hos ljung (*Calluna vulgaris*) under våren i respons på kvävegödsling. Detta ledde till markant ökad knoppbristning i mitten av maj. Det är tänkbart att kvävegödsling kunde framkalla en liknande respons hos kattfot och ärenpris som i likhet med ljung är vintergröna växter.

Ifall kattfot och ärenpris drog nytta av lupinens närvaro, vilket antyds av deras av högre klorofyllhalter under sommaren 2018, och detta är en följd av extra kväve, är det möjligt att dessa med hjälp av kvävetillskottet startade sin tillväxt tidigare på våren.

I så fall är det tänkbart att de individer som växte tillsammans med lupinen vid denna tidpunkt hade en större andel nya unga blad jämfört de som växte utan lupin. Unga blad har ofta höga koncentrationer av anthocyanin, vilket antas bero på att unga bladvävnader är känsligare för kraftigt ljus än fullt utvecklade blad och därför är i större behov av anthocyaninernas antioxidationsfunktion

i bladens epidermis (Karagergou & Manetas, 2006; Landi m. fl., 2015). De höga koncentrationerna kan därför bero på skillnader i bladens ålder hos kattfot och ärenpris mellan de olika lupinbehandlingarna och således utgöra en indirekt respons på lupinens närvaro. Det skulle förklara varför dessa skillnader inte kvarstod vid sommarens mätningar då kattfot istället hade högre anthocyaninhalter i lupinfria mesokosmer och skillnaderna mellan de olika behandlingarna var otydliga för ärenpris. Överlag uppvisade ärenpris en annorlunda respons i dess flavonoidhalter än de andra ängsarterna. Koncentrationerna av anthocyanin steg efter mätningarna i juli 2017 och hölls på ungefär samma nivå under alla följande mätomgångar, även i juli 2018. Artens flavonolhalter var tämligen höga och varierade inte märkbart mellan mätomgångar. Höga flavonoidkoncentrationer gör det möjligt för växter att upprätthålla en högre fotosyntetisk kapacitet under kalla och ljuskraftiga förhållanden (Klem m. fl., 2015; Solanki m. fl., 2019), och därmed verkar ärenpris vara välanpassad till dylika utmanande omgivningsförhållanden. Eventuellt innebar artens höga flavonoidkoncentrationer en energetisk kostnad, eftersom det kol som investerades i syntesen av flavonoider inte kunde allokeras till andra ändamål.

I sin studie av lingon rapporterade Solanki m. fl. (2019) en invers korrelation mellan anthocyanin och flavonol under året, så att höga halter av anthocyanin sammanföll med lägre halter av flavonol. Resultaten av mesokosmstudien antyder en liknande dynamik mellan dessa grupper av ämnen hos ängsväxterna. Under hösten, då Solanki m. fl. (2019) observerade höga flavonolhalter och en sänkning i anthocyaninerna, uppvisade ängsväxterna dock ett omvänt förhållande så att anthocyaninerna steg, medan flavonolhalterna sjönk. Förmodligen finns stor variation mellan arter i hur mycket epidermala flavonoider de ackumulerar. Detta avspeglar antagligen varierande strategier i hur arter tolererar föränderliga omgivningsförhållanden och det är möjligt att flavonoidbiosyntesrutten regleras under året för att finjustera flavonoidkompositionen (relativa halter anthocyanin vs. flavonol) i enlighet med de omgivningsförhållanden som råder under olika årstider (Agati m. fl., 2013).

#### **4.5. Övriga effekter av lupinens närvaro på ängsväxterna**

Hejda m. fl. (2013) visade att olika arter reagerar olika på lupinens närvaro. Detta kan möjligen också utläsas i mesokosmstudien. Störväxta arter samt gräs förefaller lida mindre risk att bli utkonkurrerade av lupinen, medan mindre örter verkar vara mer sårbara (Hejda m. fl., 2013; Loydi m. fl., 2015). Det är känt att flera arter inom släktet *Lupinus* utövar allelopatisisk aktivitet via rotkontakter, men den negativa effekten av dessa allelopatiska föreningar har visats grunda sig på att de inhiberar groningen hos frön, snarare än tillväxten hos växter som redan grott (El-Shora & El-

Gawad, 2014; Loydi m. fl., 2015). Loydi m. fl. (2015) noterade dessutom att denna typ av allelopatisk aktivitet var liten hos *L. polyphyllus* och att groningen hos andra växter i första hand inhiberades mekaniskt av den rikliga förnan som lupinen producerar.

Mesokosmstudien fokuserade inte på groningen hos ängsarterna, men eftersom lupinerna efter den första tillväxtsåsonen 2017 producerade en ganska liten mängd förna är det osannolikt att ängsarternas groning inhiberades i någon större utsträckning under våren 2018. Mer troligt är att den storvuxna lupinen stressade andra ängsarter via skuggning och brist på utrymme. Sänkta klorofyllhalter hos smultron och rödklint utgjorde eventuellt indicier om att dessa vantrivdes i närvaro av lupinen. På längre sikt kunde artsammansättningen bli mer ensidig då den fleråriga lupinen med tiden breder ut sig och ytterligare förvärrar skuggningen och utrymmesbristen så att arter som lider av detta försvinner helt.

#### **4.6. Mesokosmexperimentets inverkan på lupinens tillväxt och pigmenthalter**

De snöfattiga förhållandena under vintern på Nåtö verkade tydligt påverka lupinens tillväxt negativt under våren och sommaren 2018, då både produktionen av blad och blomställningar var märkbart reducerad jämfört med lupiner som övervintrade i Lampis. Ur en mesokosm som övervintrade på Nåtö hade lupinen försvunnit helt. Ett liknande resultat noterades av Klebesadel (1993) i Alaska där en ovanligt snöfattig vinter ledde till att lupiner (även i denna studie *L. polyphyllus*) som växte på öppna platser i huvudsak dog bort. Lupiner som växte på platser med sluten vegetation överlevde vintern. Klebesadel (1993) förmodade att detta berodde på att lupinerna i sluten vegetation skyddades av snön som ackumulerades där tack vare vegetationen, till skillnad från de lupiner som växte på öppna platser där vinden blåste bort snön så att inget snötäcke bildades. Skillnaderna i lupinernas övervintringsframgång i mesokosmstudien berodde troligen också på skillnader i snöförhållandena på övervintringsorterna. Medan mesokosmerna i Lampis ännu i slutet av mars låg under ett djupt snötäcke var mesokosmerna på Nåtö samtidigt helt snöfria och exponerade för den tidiga vårens kalla luft. På grund av detta var mullen i Nåtö-mesokosmerna infrusen i kompakt is, vilket troligen ytterligare utgjorde en svår stressfaktor för lupinerna som övervintrade med hjälp av sin underjordiska huvudrot. Resultaten tyder på att lupinen i likhet med många inhemska vintergröna växter fordrar ett befintligt snötäcke för lyckad övervintring i områden med kalla vintrar.

Det bör även noteras att nästan alla de ursprungliga lupiner som planterades i mesokosmerna i början av sommaren 2017 måste bytas ut för att de visade tecken på att dö i slutet av sommaren. De ersättande lupinplantorna hade till skillnad från de ursprungliga plantorna färdigbildade rotnölar. De nya plantorna klarade sig och tillväxte under hösten. Detta indikerar att etablerade

växtsamhällen är mindre sårbara för invasion av lupinen än störda biotoper i början av successionen som exempelvis vägrenar och ruderatmarker.

Under hösten producerade lupinerna en ny liten uppsättning blad efter att sommarens blad hade vissnat. Detta avspeglades i att lupinerna i oktober hade betydligt högre klorofyllhalter än i september. Till skillnad från ängsarterna hade lupinen vid denna tidpunkt mycket låga halter av anthocyanin. Martz m. fl. (2010) föreslår att arter som inte är adapterade till kyla inte heller ackumulerar anthocyanin i bladen. Således representerar lupinens tillväxt under senhösten möjligen en opportunistisk strategi där lupinen i egenskap av kvävefixerare investerar i kvävekrävande klorofyllsyntes utan adekvat fotoprotektion för att fortsätta fotosyntesen så länge omgivningsförhållandena tillåter det, trots att bladen inte övervintrar. De nyproducerade bladen var ännu gröna i slutet av oktober då mesokosmerna flyttades till Nåtö och Lampis, men de övervintrade inte.

I juli 2018 uppmättes hos lupinerna höga klorofyllhalter och höga nivåer av Fv/Fm, men ingen betydande skillnad syntes mellan lupiner som övervintrat på Nåtö och Lampis vilket är intressant med tanke på skillnaden i tillväxten mellan dessa. Det påvisar att inte alla typer av stress uttrycks i de optiska indikatorer som användes i studien.

## 5. Slutsatser

Resultaten av mesokosmstudien tyder på att fleråriga ängsväxter överlag tolererar varierande vinterförhållanden tämligen väl, eftersom deras klorofyllhalter och Fv/Fm inte skiljde sig märkbart mellan olika övervintringsorter. På lång sikt kunde möjligen andra effekter av mildare vintrar framkomma än de som observerades under ett år i mesokosmstudien. Lupinens övervintring verkade gynnas av den snörika vintern i inlandet i Lampis medan det maritima klimatet och den snöfattiga vintern på Nåtö var till nackdel för tillväxten och blomningen nästa sommar. Detta indikerar att arten inte kommer att gynnas i framtiden då en längre framskriden klimatuppvärmning förmodligen leder till att vinterförhållandena i inlandet blir mer lika de som nu råder vid kusten. Vidare verkade lupiner i början av sin livscykel ha svårt att etablera sig i välartad ängsvegetation. En del av ängsväxterna verkade vantrivas i närvaro av lupinen och detta verkade vara en följd av att lupinen effektivt konkurrerade om utrymme och ljus snarare än av förändrad kvävebalans i jordmånen. Kattfot och ärenpris däremot visade tecken på att gynnas av kvävetillskottet från lupinen vilket ledde till högre klorofyllhalter hos arterna under sommaren samt eventuellt tidigarelagd tillväxtstart på våren. Lupinens långsiktiga inverkan på ängsarterna kan dock vara annorlunda än vad som observerades under de första två tillväxtsåongerna efter att lupinen planterades. Flavonoidkompositionen hos ängsväxterna föreföll regleras av förändringar i

ljusintensitet och temperatur under olika årstider så att flavonolhalterna växte i respons på hög ljusintensitet under sommaren, medan anthocyanin ackumulerades till följd av kombinationen av ljus och kalla temperaturer. Eftersom observerade skillnader i pigmenthalter och Fv/Fm bara i en del av fallen var statistiskt signifikanta bör slutsatser dras med försiktighet. En svaghet med studien är att fokus inte lades på ängsväxternas tillväxt. En mer komplett bild av hur olika övervintringsförhållanden samt lupinens närvaro påverkar ängsväxternas övervintring och tillväxt skulle erhållas av en studie som fokuserar på tillväxtframgång i form av tillväxtstart samt producerad biomassa och blomning.

## 6. Tack

Jag vill rikta ett stort tack till Timo Saarinen och Helena Åström som startade projektet och handledde mig under utförandet. Vidare vill jag tacka hela PECC-gruppen (*Plant Ecophysiology and Climate Change*) för stöd och värdefull input. Tack till Annika Luther för språkgranskning och särskilt tack till Vanamo ry. för stipendium för utförande av pro gradu.

## 7. Källor

**Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M. 2012.** Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*. **196**: 67–76.

**Agati G, Brunetti C, Di Ferdinando M, Ferrini F, Pollastri S, Tattini M. 2013.** Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry*. **72**: 35–45.

**Andrews CJ. 1996.** How Do Plants Survive Ice?. *Annals of Botany*. **78**: 529–536.

**Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP). 2017.** *Snow, Water, Ice and Permafrost in the Arctic (SWIPA) 2017*.

**Baker NR. 2008.** Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*. **59**: 89–113.

**Barthod S, Cerovic ZG, Epron D. 2007.** Can dual chlorophyll fluorescence excitation be used to assess the variation in the content of UV-absorbing phenolic compounds in leaves of temperate tree species along a light gradient?. *Journal of Experimental Botany*. **58**: 1753–1760.

**Berry J, Björkman O. 1980.** Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*. **31**: 491–543.

**Bilbrough CJ, Welker JM, Bowman WD. 2000.** Early spring nitrogen uptake by snow-covered plants: a comparison of arctic and alpine plant function under the snowpack. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*. **32**: 404–411.

- Bokhorst S, Bjerke JW, Bowles FW, Callaghan TV, Melillo J, Phoenix GK. 2008.** Impacts of extreme winter warming in the sub-Arctic: growing season responses of dwarf shrub heathland. *Global Change Biology*. **14**: 2603–2612.
- Bokhorst S, Bjerke JW, Street LE, Callaghan TV, Phoenix GK. 2011.** Impacts of multiple extreme winter warming events on sub-Arctic heathland: Phenology, reproduction, growth, and CO<sub>2</sub> flux responses. *Global Change Biology*. **17**: 2817–2830.
- Bokhorst SF, Bjerke JW, Tømmervik H, Callaghan TV, Phoenix GK. 2009.** Winter warming events damage sub-Arctic vegetation: consistent evidence from an experimental manipulation and a natural event. *Journal of Ecology*. **97**: 1408–1415.
- Braun V, Neuner G. 2005.** Response of effective quantum yield of photosystem 2 to in situ temperature in three alpine plants. *Photosynthetica*. **42**: 607–613.
- Buchanan B, Gruissem W, Jones RL. 2015.** *Biochemistry and Molecular Biology of Plants, 2<sup>nd</sup> Edition*. Wiley Blackwell. New Jersey. 1280 s.
- Cartelat A, Cerovic ZG, Goulas Y, Meyer S, Lelarge C, Prioul JL, Moya I. 2005.** Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research*. **91**: 35–49.
- Cerovic ZG, Masdoumier G, Ghazlen N, Latouche G. 2012.** A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiologia Plantarum*. **146**: 251–260.
- Chalker-Scott L. 1999.** Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology*. **70**: 1–9.
- Corré WJ. 1983.** Growth and morphogenesis of sun and shade plants I. The influence of light intensity. *Acta Botanica Neerlandica*. **32**: 49–62.
- Dai Y, Shen Z, Liu Y, Wang L, Hannaway D, Lu H. 2009.** Effects of shade treatments on the photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence, and chlorophyll content of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg. *Environmental and Experimental Botany*. **65**: 177–182.
- Edreva A. 2005.** The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. *Agriculture Ecosystems & Environment*. **106**: 135–146.
- El-Shora HM, Abd El-Gawad AM. 2014.** Evaluation of Allelopathic Effect of White Lupin (*Lupinus termis* L.) Leaf Extract on the Biochemical Dynamics of Common Purslane (*Portulaca oleracea* L.). *Journal of Botany*. **54**: 317–332.
- Feild TS, Lee DW, Holbrook NM. 2009.** Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant Physiology*. **127**: 566–574.
- Goulas Y, Cerovic ZG, Cartelat A, Moya I. 2004.** Dualex: a new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. *Applied Optics*. **43**: 4488–4496.



**Gould KS. 2004.** Nature's swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **5**: 314–320.

**Guidi L, Lorefice G, Pardossi A, Malorgio F, Tognoni F, Soldatini GF. 1997.** Growth and photosynthesis of *Lycopersicon esculentum* (L.) plants as affected by nitrogen deficiency. *Biologia Plantarum*. **40**: 235–244.

**Hejda M. 2013.** Do species differ in their ability to coexist with the dominant alien *Lupinus polyphyllus*? A comparison between two distinct invaded ranges and a native range. *NeoBiota*. **17**: 39–55.

**Huang CJ, Wei G, Jie YC, Xu JJ, Anjum SA, Tanveer M. 2016.** Effect of shade on plant traits, gas exchange and chlorophyll content in four ramie cultivars. *Photosynthetica*. **54**: 390–395.

**Hughes NM, Smith WK. 2007.** Seasonal photosynthesis and anthocyanin production in 10 broadleaf evergreen species. *Functional Plant Biology*. **34**: 1072–1079.

**Jaakola L, Hohtola A. 2010.** Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. *Plant, Cell & Environment*. **33**: 1239–1247.

**Jalas J. (Red.). 1965.** *Suuri kasvikirja*. Otava. Helsingfors.

**Jylhä K, Fronzek S, Tuomenvirta H, Carter TR, Ruosteenoja K. 2007.** Changes in frost, snow and Baltic sea ice by the end of the twenty-first century based on climate model projections for Europe. *Climatic Change*. **86**: 441–462.

**Kalela A, Väänänen H. (Red.). 1961.** *Pohjolan luonnonkasvit*. Werner Söderström. Helsingfors

**Kalisz A, Jezdinský A, Pokluda R, Sękara A, Grabowska A, Gil J. 2016.** Impacts of chilling on photosynthesis and chlorophyll pigment content in juvenile basil cultivars. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. **57**: 330–339.

**Karageorgou P, Manetas Y. 2006.** The importance of being red when young: anthocyanins and the protection of young leaves of *Quercus coccifera* from insect herbivory and excess light. *Tree Physiology*. **26**: 613–621.

**Kellomäki S, Maajärvi M, Strandman H, Kilpeläinen A, Peltola H. 2010.** Model computations on the climate change effects on snow cover, soil moisture and soil frost in the boreal conditions over Finland. *Silva Fennica*. **44**: 213–233.

**Klebesadel LJ. 1993.** Winter Survival of Grasses and Legumes in Subarctic Alaska as Related to Latitudinal Adaptation , Pre-Winter Storage of Food Reserves , and Dry-Matter Concentration in Overwintering Tissues. *Agricultural and forestry experiment station*. Bulletin **94**

**Klem K, Holub P, Štroch M, Nezval J, Špunda V, Tríska J, Jansen MA, Robson TM, Urban O. 2015** Ultraviolet and photosynthetically active radiation can both induce photoprotective capacity allowing barley to overcome high radiation stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. **93**: 74–83.

**Kreyling J, Henry HAL. 2011.** Vanishing winters in Germany: soil frost dynamics and snow cover trends, and ecological implications. *Climate Research*. **46**: 269-276.

**Kreyling J. 2010.** Winter climate change: A critical factor for temperate vegetation performance. *Ecology*. **91**: 1939–1948.

**Lampinen R, Lahti T. 2019.** *Kasviatlas 2018. Helsingin Yliopisto, Luonnontieteellinen keskusmuseo, Helsinki*. Utbredningskartor på adressen: <http://koivu.luomus.fi/kasviatlas>.

**Landi M, Tattini M, Gould KS. 2015.** Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. *Environmental and Experimental Botany*. **119**: 4–17.

**Larsen KS, Michelsen A, Jonasson S, Beier C, Grogan P.** Nitrogen uptake during fall, winter and spring differs among plant functional groups in a subarctic heath ecosystem. *Ecosystems*. **15**: 927-939.

**Lawson T, Kramer DM, Raines CA. 2012.** Improving yield by exploiting mechanisms underlying natural variation of photosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*. **23**: 215–220.

**Logan BA, Adams III WW, Demmig-Adams B. 2007.** Avoiding common pitfalls of chlorophyll fluorescence under field conditions. *Functional Plant Biology*. **34**: 853–859.

**Loydi A, Donath TW, Eckstein RL, Otte A. 2015.** Non-native species litter reduces germination and growth of resident forbs and grasses: allelopathic, osmotic or mechanical effects?. *Biological Invasions*. **17**: 581–595.

**Lundell R, Saarinen T, Hänninen H. 2010.** Effects of snowmelt on the springtime photosynthesis of the evergreen dwarf shrub *Vaccinium vitis-idaea*. *Plant Ecology and Diversity*. **3**: 121–130.

**Lundell R, Saarinen T, Åström H, Hänninen H. 2011.** The boreal dwarf shrub *Vaccinium vitis-idaea* retains its capacity for photosynthesis through the winter. *Botany*. **86**: 491–500.

**Martz F, Jaakola L, Julkunen-Tiitto R, Stark S. 2010.** Phenolic composition and antioxidant capacity of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) leaves in Northern Europe following foliar development and along environmental gradients. *Journal of chemical ecology*. **36**: 1017–1028.

**Mauro RP, Occhipinti A, Longo AM, Mauromicale G. 2011.** Effects of shading on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence and photosynthesis of subterranean clover. *Journal of Agronomy and Crop Science*. **197**: 57–66.

**Mauromicale G, Ierna A, Marchese M. 2006.** Chlorophyll fluorescence and chlorophyll content in field-grown potato as affected by nitrogen supply, genotype, and plant age. *Photosynthetica*. **44**: 76–82.

**Maxwell K, Johnson GN. 2000.** Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Biology*. **51**: 659–668.

**Menzel A, Fabian P. 1999.** Growing season extended in Europe. *Nature*. **397**: 659.

Meteorologiska institutet. <http://ilmatieteenlaitos.fi/tilastoja-vuodesta-1961> (läst 12.1 2018).

**Mikkonen S, Laine M, Mäkelä HM, Gregow H, Tuomenvirta H, Lahtinen M, Laaksonen A. 2015.** Trends in the average temperature in Finland, 1847–2013. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment*. **29**: 1521–1529.

**Miller AE, Bowman WD, Suding KN. 2007.** Plant uptake of inorganic and organic nitrogen: neighbor identity matters. *Ecology*. **88**:1832–1840.

**Murchie EH, Lawson T. 2013.** Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*. **64**: 3983–3998.

**Neill SOJ. 2002.** The functional role of anthocyanins in leaves. Ph.D *School of Biological Sciences. University of Auckland*.

**Odum PE. 1984.** The mesocosm. *Bioscience*. **34**: 558–562.

**Peng S, Garcia FV, Laza RC, Sanico AL, Visperas RM, Cassman KG. 1996.** Increased N-use efficiency using a chlorophyll meter on high-yielding irrigated rice. *Field Crops research*. **47**: 243–252.

**Power SA, Ashmore MR, Cousins DA, Sheppard LJ. 1998.** Effects of nitrogen addition on the stress sensitivity of *Calluna vulgaris*. *The New Phytologist*. **138**: 663–673.

**Pykälä J. 2001.** Perinteinen karjatalous luonnon monimuotoisuuden ylläpitäjänä. Suomen ympäristökeskus. Vammalan Kirjapaino Oy. Vammala.

**Ramula S, Pihlaja K. 2012.** Plant communities and the reproductive success of native plants after the invasion of an ornamental herb. *Biological Invasions*. **14**: 2079–2090.

**Rapantová B, Klem K, Holub P, Novotná K, Urban O. 2016.** Photosynthetic response of mountain grassland species to drought stress is affected by UV-induced accumulation of epidermal flavonoids. *Beskydy*. **9**: 31–40

**Rezai S, Etemadi N, Nikbakht A, Yousefi M, Majidi MM. 2018.** Effect of light intensity on leaf morphology, photosynthetic capacity, and chlorophyll content in sage (*Salvia officinalis* L.). *원예과학기술지*. **36**: 46–57.

**Richardson DM, Holmes PM, Esler KJ, Galatowitsch SM, Stromberg JC, Kirkman SP, Py P, Hobbs RJ. 2007.** Riparian vegetation: degradation, alien plant invasions, and restoration prospects. *Diversity and Distributions*. **13**: 126–139.

**Robson TM, Klem K, Urban O, Jansen MA. 2015.** Re-interpreting plant morphological responses to UV-B radiation. *Plant, Cell & Environment*. **38**: 856–66.

**Saarinen T, Lundell R, Hänninen H. 2011.** Recovery of photosynthetic capacity in *Vaccinium vitis-idaea* during mild spells in winter. *Plant Ecology*. **212**: 1429–1440.

**Samanta A, Das G, Das SK. 2011.** Roles of flavonoids in plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Technology*. **6**: 12–35.

- Schulz E, Tohge T, Zuther E, Fernie AR, Hinch DK. 2016.** Flavonoids are determinants of freezing tolerance and cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*. **6**: 1–10.
- Sevanto S, Suni T, Pumpanen J, Grönholm T, Kolari P, Nikinmaa E, Hari P, Vesala T. 2011.** Wintertime photosynthesis and water uptake in a boreal forest. *Tree Physiology*. **26**: 749–757.
- Shangguan Z, Shao M, Dyckmans J. 2000.** Effects of nitrogen nutrition and water deficit on net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in winter wheat. *Journal of Plant Physiology*. **156**: 46–51.
- Shen Q, Chu G. 2004.** Bi-directional nitrogen transfer in an intercropping system of peanut with rice cultivated in aerobic soil. *Biology and Fertility of Soils*. **40**: 81–87.
- Solanki T, Aphalo PJ, Neimane S, Hartikainen SM, Pieristè M, Shapiguzov A, Porcar-Castell A, Atherton J, Heikkilä A, Robson TM. 2019.** UV-screening and springtime recovery of photosynthetic capacity in leaves of *Vaccinium vitis-idaea* above and below the snowpack. *Plant Physiology and Biochemistry*. **134**: 40–52.
- Starr G, Oberbauer SF. 2003.** Photosynthesis of arctic evergreens under snow: Implications for tundra ecosystem carbon balance. *Ecology*. **84**: 1415–1420.
- Stewart AJ, Chapman W, Jenkins GI, Graham I, Martin T, Crozier A. 2001.** The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant, Cell & Environment*. **24**: 1189–1197.
- Stewart RIA, Dossena M, Bohan DA, Jeppesen E, Kordas RL, Ledger ME, Meerhoff M, Moss B, Mulder C, Shurin JB, Suttle B, Thompson R, Trimmer M, Woodward G. 2013.** Mesocosm experiments as a tool for ecological climate-change research. *Advances in Ecological Research*. **48**: 72–117.
- Steyn WJ, Wand SJE, Holcroft DM, Jacobs G. 2002.** Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*. **155**: 349–361.
- Stirbet A. 2011.** On the relationship between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. **104**: 236–257.
- Taarna J. (Red.). 1995.** *Pohjolan kasvit*. Tammi. Helsingfors.
- Temperton VM, Mwangi PN, Scherer-Lorenzen M, Schmid B, Buchmann N. 2007.** Positive interactions between nitrogen-fixing legumes and four different neighbouring species in a biodiversity experiment. *Oecologia*. **151**: 190–205.
- Valtonen A, Jantunen J, Saarinen K. 2006.** Flora and lepidoptera fauna adversely affected by invasive *Lupinus polyphyllus* along road verges. *Biological Conservation*. **133**: 389–396.
- Wang H, Huo Z, Zhou G, Liao Q, Feng H, Wu L. 2016.** Estimating leaf SPAD values of freeze-damaged winter wheat using continuous wavelet analysis. *Plant Physiology and Biochemistry*. **98**: 39–45.

**Xiao Y, Li L, Zhang F. 2004.** Effect of root contact on interspecific competition and N transfer between wheat and fababean using direct and indirect  $^{15}\text{N}$  techniques. *Plant and Soil*. **262**: 45–54.

**Xiong D, Chen J, Yu T, Gao W, Ling X, Li Y, Peng S, Huang J. 2015.** SPAD-based leaf nitrogen estimation is impacted by environmental factors and crop leaf characteristics. *Scientific Reports*. **5**: 1–12.

**Åström H, Saarinen T, Lundell R, Rasmus S, Edgren E, Alho S, Hänninen H. 2012.** Lauhat talvet – edut ja haitat kasvien talvehtimiselle. *Luonnon tutkija*. **2**: 4-12.